

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

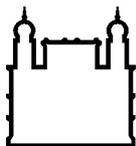
### **Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**“IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROVÍRUS HUMANOS A PARTIR DE AMOSTRAS FECAIS DE CRIANÇAS MENORES DE 15 ANOS, ATENDIDAS NO HOSPITAL GERAL DE MAVALANE NA CIDADE DE MAPUTO, MOÇAMBIQUE”**

**DIOCRECIANO MATIAS BERO**

**Rio de Janeiro**

**2012**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

***DIOCRECIANO MATIAS BERO***

IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROVÍRUS HUMANOS A PARTIR DE AMOSTRAS FECAIS DE CRIANÇAS MENORES DE 15 ANOS, ATENDIDAS NO HOSPITAL GERAL DE MAVALANE NA CIDADE DE MAPUTO, MOÇAMBIQUE.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz, à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle.

**Orientadores:** Prof. Dr. Edson Elias da Silva

**Co-orientador:** Prof. Dr. Ilesh Vinodrai Jani

**RIO DE JANEIRO**

Setembro 2012

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

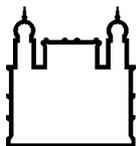
B532 Bero, Diocreciano Matias

Identificação de enterovírus humanos a partir de amostras fecais de crianças menores de 15 anos, atendidas no Hospital Geral de Mavalane na cidade de Maputo, Moçambique / Diocreciano Matias Bero. – Rio de Janeiro, 2012.  
xiv, 71 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2012.  
Bibliografia: f. 64-72

1. Enterovírus. 2. Crianças. 3. Fezes. 4. Cultura celular. 5. Identificação molecular . 6. Hospital Geral de Mavalane. I.Título

CDD 579.257 2



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Medicina Tropical**

Dissertação de Mestrado, intitulada:

“IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROVÍRUS HUMANOS A PARTIR DE AMOSTRAS FECAIS DE CRIANÇAS MENORES DE 15 ANOS, ATENDIDAS NO HOSPITAL GERAL DE MAVALANE NA CIDADE DE MAPUTO, MOÇAMBIQUE”

Apresentado por

*Diocreciano Matias Bero*

Orientador: Prof. Dr. Edson Elias da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Ilesh Vinodrai Jani

Foi avaliada e aprovada, em: 28/09/2012, pela banca examinadora, composta pelos seguintes membros,

Examinadores:

---

Dra. Marcia Leite Baptista - Presidente – IOC/ Fundação Oswaldo Cruz

---

Dra. Eliane Viegas da Costa – IOC/ Fundação Oswaldo Cruz

---

Dra. Sílvia Baeta Cavalcanti – UFF/ Universidade Federal Fluminense

---

Dr. Filipe Aníbal Carvalho Costa – IOC/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos – IOC/Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, Setembro de 2012

## **DEDICATÓRIA**

*À Deus por me guiar nesta caminhada,*

*À meus pais, Languitone Bero e Inácia Alfredo Matias, pelo apoio incondicional e por me ensinarem a lutar por ideais, através do exemplo de vida e de trabalho.*

*Às minhas irmãs, Victória, Nerlete, Cremilda e Clesia, que me proporcionaram as condições para a realização de meu sonho de obtenção do conhecimento.*

*Às minhas sobrinhas, Sheila, Genesia, Bela e Afo, pela paciência, amor, carinho, que os quattros sorrisos me enradiaram sempre nesta caminhada.*

*“Combati um bom combate,  
“Acabei a carreira, guardei a fé”  
(2 Timóteo 4:7)*

*“Pedi, e dar-se-vos-á;  
buscai, e encontrareis; batei e abrir-se-vos-á.  
Porque, aquele que pede, recebe;  
e, o que busca, encontra; e, ao que bate, abrir-se-lhe-á.”  
(Mateus, 7:7-8)*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores Dr Edson da Silva e Dr Ilesh Vinodrai Jani, por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência, e por serem exemplos de profissionais.

À Coordenação, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, pela oportunidade de ingressar no Mestrado. A todos os colegas e Docentes do Programa, pelo apoio, pelas aulas e esclarecimentos dados ao longo desses dois longos anos.

Ao Instituto Nacional de Saúde de Moçambique, pela oportunidade e ao Ministério da Saúde de Moçambique pelo apoio financeiro concedido.

Ao Dr Paulo Ivo Garrido, Ex-Ministro da Saúde de Moçambique e Dr Ilesh Jani, Director do Instituto Nacional de Saúde, pela confiança e incentivo, ao abraçar este projeto de formação e a pela oportunidade de aprendizagem na FIOCRUZ.

A todo pessoal que me ajudou a tornar esta jornada mais prazerosa no Laboratório, tornando a carga mais leve de carregar, principalmente: Dra Eliane, Dra Fernanda, Silas, Josi, Éricka, Elaine, Emanuele, Gina, Fernando, Cátia, Amanda, Taty, muito obrigado pela amizade, carinho, convivência, pelas dicas e por toda a ajuda em todas as fases, contribuindo para o meu crescimento profissional.

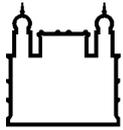
Aos colegas do Instituto Nacional de Saúde de Moçambique, em especial a Dra Nilza de Deus. Ao Dr Ussene Isse, Director do Hospital Geral de Mavalane por ter aceite a realização do estudo e a enfermeira Fátima pelo apoio durante a coleta das amostras.

Minha eterna gratidão aos meus pais Bero e Inácia, pelo apoio, incentivo e pelo exemplo de honestidade e responsabilidade. As minhas irmãs: Victória, Nerlete, Cremilda e Clesia, os meus quatro grandes amores. À minha família, a qual tenho muito afeto; pelo carinho, paciência e incentivo, principalmente as minhas sobrinhas: Sheila, Bela, Genesis e Afo.

Aos amigos, Fábio, Eduardo, Pe Carlinhos, Droba, Rosa, Família Munguambe, Família Majuta, Hermenes, Dra Marta, Dra Angela, Dra Alda, Dr Filipe, ao Grupo Paz e Bem, que sempre mi ajudaram e incentivaram. Aos colegas: Almiro, Gaby, Jo, Sádía, Jeronimo e Cátia.

A todos aqueles que, por lapso, esqueci de mencionar e que foram importantes para a realização desta caminhada, meu obrigado “*nda thenda*”.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Enterovírus,  
Centro de Referência Nacional para Enterovírus,  
no Departamento de Virologia, do Instituto Oswaldo Cruz,  
Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro,  
sob a orientação do Dr. Edson Elias da Silva e Dr. Ilesh Vinodrai Jani.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

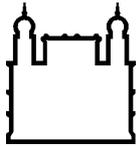
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### RESUMO

#### **IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROVÍRUS HUMANOS A PARTIR DE AMOSTRAS FECAIS DE CRIANÇAS MENORES DE 15 ANOS, ATENDIDAS NO HOSPITAL GERAL DE MAVALANE NA CIDADE DE MAPUTO, MOÇAMBIQUE**

Os enterovírus humanos (HEV) são espécies do género *Enterovirus*, família *Picornaviridae*. Existem cerca de 120 sorotipos de HEV que são divididos em quatro espécies, designadas de HEV-A a D. Estes agentes infectam anualmente, milhões de pessoas no mundo, resultando em uma grande variedade de quadros clínicos que vão desde infecções inaparentes à febres inespecíficas, resfriado comum, à doenças graves, tais como meningite e poliomielite parálitica. As crianças são mais susceptíveis à infecção. A transmissão ocorre tanto pela via entérica e por via respiratória. O vírus pode ser excretado nas fezes por várias semanas. Este estudo teve como objectivo isolar e identificar os sorotipos de HEVs circulantes, a partir de amostras de fezes de crianças menores de 15 anos de idade, com quadros compatíveis a infecção por esses agentes, no Hospital Geral de Mavalane na Cidade de Maputo, em Moçambique. Neste trabalho, foram utilizadas 178 amostras de fezes obtidas entre novembro de 2011 a fevereiro de 2012. As amostras foram inoculadas em culturas de células e os enterovírus isolados foram identificados através de métodos moleculares, nas amostras negativas foi pesquisado o adenovírus. Das 45 amostras positivas em cultivos celulares, os enterovírus foram isolados e identificados em 26 (14,6 %). A proporção sexo masculino e feminino foi de 1,8: 1. O isolamento dos enterovírus diminuiu à medida que a idade aumentou. O sequenciamento genómico revelou uma grande diversidade de enterovírus humanos. Entre os 26 enterovírus isolados, o Echovírus 29 foi o agente mais identificado com 19,2 %, seguido pelo Enterovírus 99 (11,5%). Foram identificados também Coxsackievírus A5, Echovírus sorotipos 11, 13 e Enterovírus C com 7,7 % de cada ; Coxsackievírus sorotipos A10, A13, A20, B4 e B6 com 3,85 % cada; Echovírus sorotipos 7, 21 e 25, com 3,85 % cada um, e Poliovírus sorotipos 2 e 3 com 3,85 %, respectivamente. Adenovírus foram isolados em 20 amostras, representando 11,2 % do total (20/178). Duas amostras apresentaram co-infecção enterovírus/adenovírus. Os resultados deste trabalho evidenciam a circulação de uma grande diversidade enterovírus humanos na cidade de Maputo, sendo os echovírus mais frequentes, mas também mostra a circulação de adenovírus humanos. Outros testes laboratoriais seriam necessários, para se relacionar inequivocamente a participação desses agentes virais na etiologia dos quadros clínicos observados.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **ABSTRACT**

#### **IDENTIFICATION OF HUMAN ENTEROVIRUSES FROM FECAL SAMPLES OF CHILDREN YOUNGER THAN 15 YEARS OLD, IN MAVALANE GENERAL HOSPITAL IN MAPUTO CITY, MOZAMBIQUE**

The human enteroviruses (HEV) are species of the genus *Enterovirus*, family *Picornaviridae*. There are about 120 serotypes of HEV divided into four species, designated HEV- A to D. These agents infect millions of people worldwide each year, resulting in a wide variety of clinical conditions ranging from unapparent infection, undifferentiated fevers, and common cold to serious diseases such as meningitis and paralytic poliomyelitis. Children are more susceptible to infection. Transmission occurs by the fecal-oral and respiratory tract. The virus can be excreted in the feces for several weeks. The aim of this study was to isolate and identify human enteroviruses from stool samples of children less than 15 years of age presenting enterovirus compatible symptoms in Mavalane General Hospital in Maputo City, Mozambique. In this study, we used 178 stool samples from children under 15 years of age, obtained from November, 2011 to February, 2012. Samples were inoculated onto cell culture and the enterovirus isolates were identified by molecular methods, the negative samples were screened for adenovirus. Twenty-six out of the 45 cell-culture positive samples were constituted by enteroviruses (14.6 %). The ratio between male and female was 1.8:1. Isolation of enterovirus decreases as the age increased. The genomic sequencing showed a diversity of human enterovirus. Among the 26 isolates, Echovirus serotype 29 was the most identified with 19.2 %; Coxsackievirus 99 was identified in 11.5 %, while Coxsackievirus A5, Echovirus serotypes 11, 13 and Enterovirus C, were identified in 7.7 % each. Coxsackievirus serotypes A10, A13, A20, B4 and B6 were present in 3.85 % each; Echovirus serotypes 7, 21 and 25, at 3.85 %, and poliovirus serotypes 2 and 3 in 3.85 %, respectively. Adenoviruses were isolated from 20 samples, 11.2 % (20/178). Two samples showed co-infection with both enterovirus and adenoviruses. The results of this study showed a great diversity of enterovirus serotypes in the city of Maputo and echovirus was the most prevalent enterovirus found. We also showed the circulation of adenoviruses. However other laboratorial tests would be necessary in order to unequivocally correlate the participation of these viral agents in the etiology of the observed clinical findings.

## LISTA DE ABREVIATURAS

5'NC	Região terminal não codificante do RNA
BPN	Bronquiopneumonia
CDC	Center for Disease Control and Prevention
c-DNA	DNA complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP's	Dinucleotídeos Tri-Fosfato
ddNTP's	Dideoxynucleotídeos Tri-Fosfato
DP	Desvio padrão
DTT	Di-Thio-Treitol
ECP	Efeito citopático
EV	Enterovírus
g	Grama
GEA	Gastroenterite aguda
HCl	Ácido clorídrico
HeLa	Célula originária de carcinoma epitelial de cérvix humano
HEp2C	Célula de carcinoma epidermóide de laringe humana
HEV	Enterovírus Humanos
HGM	Hospital Geral de Mavalane
HIV	Vírus de imunodeficiência adquirida
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IIQ	Intervalo interquartilico
IRA	Infecções respiratórias agudas
Km	Quilometro
L20B	Células L de camundongo expressando o receptor para os poliovírus
LEV	Laboratório de Enterovírus
LIV	Laboratório de Isolamento Viral
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RD	Célula de rdbomiosarcoma embrionário humano
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
UV	Luz Ultravioleta
V	Volts
Vero	Célula de rim de macaco, <i>Cercopithecus aethiops</i>
VPg	<i>Virion Protein genome</i>
VP1	Proteína estrutural 1
WI-38	Célula oriunda de fibroblasto de pulmão humano
µg	Micrograma
µL	Microlitro

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Esquema ilustrativo do capsídeo de um Enterovírus com as proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4.....	08
<b>Figura 1.2</b> Esquema do genoma dos Enterovírus.....	09
<b>Figura 1.3</b> Ciclo replicativo dos Enterovírus.....	12
<b>Figura 1.4</b> Patogênese da infecção pelos Enterovírus no Homem.....	14
<b>Figura 1.5</b> Casos de Poliomielite, 1981 – 2008 em Moçambique.....	19
<b>Figura 3.1</b> Mapa da África, Moçambique e perfil da planta da área de Saúde de Mavalane.....	24
<b>Figura 3.2</b> Fluxograma simplificado do processamento laboratorial.....	27
<b>Figura 4.1</b> Distribuição temporal da coleta das amostras (novembro de 2011 – fevereiro de 2012).....	38
<b>Figura 4.2</b> Distribuição geográfica dos participantes do estudo em relação aos bairros de origem.....	40
<b>Figura 4.3</b> Linhagens celulares, L20B (1a) e RD (2a) antes da inoculação da amostra; L20B (1b) e RD (2b), após inoculação e apresentação de efeito citopático.....	40
<b>Figura 4.4</b> Perfil eletroforético dos produtos amplificados por RT-PCR, para a identificação do grupo Enterovírus, utilizando o par de iniciadores EVR-EVF (153 pb).....	41
<b>Figura 4.5</b> Perfil eletroforético dos produtos amplificados por RT-PCR, para a identificação de poliovírus entre os membros do gênero Enterovírus, utilizando o par de iniciadores PVR-PVF (79 pb).....	43
<b>Figura 4.6</b> Perfil eletroforético dos produtos amplificados, por PCR, para a identificação molecular dos Enterovírus, utilizando o par de iniciador 222-292 (357 pb).....	44
<b>Figura 4.7</b> Frequência de enterovírus isolados a partir de amostras fecais de crianças menores de 15 anos, no HGM na cidade de Maputo, Moçambique.....	45
<b>Figura 4.8</b> Árvore filogenética mostrando as amostras identificadas como enterovírus humanos da espécie A.....	47
<b>Figura 4.9</b> Árvore filogenética mostrando os enterovírus isolados pertencentes à espécie B.....	48
<b>Figura 4.10</b> Árvore filogenética mostrando os enterovírus isolados pertencentes à espécie C.....	49
<b>Figura 4.11</b> Distribuição geográfica e temporal das amostras positivas aos enterovírus.....	51
<b>Figura 4.12</b> Perfil eletroforético obtidos, durante a PCR Adenovírus, utilizando o par de iniciador AD1-AD4 (134pb).....	52
<b>Figura 4.13</b> Distribuição geográfica e temporal das amostras positivas aos adenovírus humanos em consonância com a zona de origem.....	54

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> Classificação dos Enterovírus humanos baseada na análise filogenética do genoma viral.....	7
<b>Tabela 4.1</b> Características sócio-demográficas e clínicas dos participantes do estudo.....	39
<b>Tabela 4.2</b> Amostras que apresentaram efeito citopático e foram positivas na RT-PCR para membros do gênero <i>Enterovirus</i> (PCR PAN-EV).....	42
<b>Tabela 4.3</b> Características sociodemográficas dos participantes com amostras positivas para gênero <i>Enterovirus</i> .....	46
<b>Tabela 4.4</b> Correlação entre manifestações clínicas, reportadas nos participantes e as espécies de Enterovírus humano identificados.....	47
<b>Tabela 4.5</b> Sorotipos de enterovírus identificados, e alguns dados sociodemográficos e clínicos de crianças menores de 15 anos, atendidas no HGM na cidade Maputo.....	50
<b>Tabela 4.6</b> Principais características sociodemográficas e clínicas dos participantes, que tiveram as amostras positivas para adenovírus humanos.....	53

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos gerais dos Enterovírus humanos .....	1
1.2 Epidemiologia dos Enterovírus humanos.....	2
1.3 Modo de transmissão dos Enterovírus humanos .....	3
1.4 Período de transmissibilidade dos Enterovírus humanos.....	3
1.5 Características clínicas de infecção pelos Enterovírus humanos .....	4
1.6 Controle e tratamento de infecções por Enterovírus humanos.....	4
1.7 Diagnóstico laboratorial dos Enterovírus humanos.....	4
1.8 Etiologia das infecções por Enterovírus humanos.....	5
1.9 Classificação taxonômica dos Enterovírus humanos .....	6
1.10 Estrutura dos Enterovírus humanos.....	7
1.11 Características físico-químicas dos Enterovírus humanos .....	9
1.12 Distribuição geográfica dos Enterovírus humanos.....	9
1.13 Ciclo replicativo dos Enterovírus humanos.....	10
1.14 Características antigênicas dos Enterovírus humanos.....	12
1.15 Patogenia e imunidade dos Enterovírus humanos .....	13
1.16 Doenças causadas pelos Enterovírus humanos.....	14
1.17 Isolamento dos Enterovírus humanos.....	17
1.18 Detecção e identificação de Enterovírus humanos.....	17
1.19 Perfil de saúde da criança Moçambicana.....	18
1.20 Programa de vacinação contra a poliomielite em Moçambique.....	19
1.21 Justificativa.....	21
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral .....	22
2.2 Objetivos específicos .....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Amostras Clínicas .....	23
3.2 Descrição da área e população de estudo.....	23
3.3 Considerações éticas.....	25

3.4 Desenho do estudo .....	25
3.5 Critérios de inclusão .....	25
3.6 Critérios de exclusão.....	26
3.7 Análise do perfil dos participantes.....	26
3.8 Coleta, transporte e conservação das amostras .....	26
3.9 Processamento laboratorial das amostras .....	27
3.10 Clarificação das amostras fecais .....	28
3.11 Isolamento viral em linhagens de cultura celular .....	28
3.12 Detecção de enterovírus entre os isolados em linhagens de cultura celular.....	29
3.12.1 RT-PCR PAN-EV para detecção de membros do gênero <i>Enterovirus</i> .....	29
3.12.2 Avaliação dos produtos de RT-PCR da Região 5'NC por eletroforese em gel de acrilamida .....	31
3.13 RT-PCR PAN-PV para identificação de poliovírus.....	31
3.14 Identificação molecular dos enterovírus isolados.....	31
3.14.1 Extração de RNA viral.....	31
3.14.2 Síntese do DNA complementar (c-DNA).....	32
3.14.3 Reação em Cadeia da Polimerase para enterovírus não-pólio .....	33
3.14.5 Avaliação do produto da PCR em gel de agarose.....	33
3.14.6 Purificação do DNA .....	33
3.14.6 Quantificação da concentração de DNA.....	34
3.14.7 Reações de sequenciamento .....	34
3.14.8. Reações de sequenciamento para enterovírus não-pólio .....	35
3.14.9. Reações de sequenciamento para enterovírus pólio .....	35
3.14.10 Purificação dos produtos das reações do sequenciamento.....	35
3.14.11 Sequenciamento e análise das sequências .....	36
3.15 Pesquisa de adenovírus humanos.....	36
3.16 Métodos estatísticos.....	37
4. RESULTADOS .....	38
4.1 Amostras clínicas .....	38
4.2. Características sociodemográficas e clínicas dos participantes.....	38
4.3. Isolamento viral em cultura celular .....	40

5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES.....	62
7. PERSPECTIVAS .....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXOS.....	I
Anexo 1. Carta de aprovação do Comité Nacional de Bioética em Saúde de Moçambique...II	
Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....III	
Anexo 3. Formulário de recolha de dados.....VI	
Anexo 4. Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR, sequenciamento e PCR.....VII	

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais dos Enterovírus humanos

Os Enterovírus humanos são vírus de transmissão predominantemente entérica. Estão presentes em todo o mundo e são um dos agentes mais prevalentes entre os causadores de doenças em seres humanos. A maioria das infecções é assintomática, mas os enterovírus podem causar um largo espectro de doenças, incluindo quadros graves envolvendo o sistema nervoso central (Melnick, 1984; Strikas, 1986). Em climas temperados, as infecções ocorrem principalmente no verão e no outono, enquanto que nos climas tropicais existe uma tendência dessas infecções estarem distribuídas pelo ano todo (Moore e Morens, 1984).

Estes vírus não estão comumente associados a infecções entéricas. Eles são assim denominados porque o aparelho digestivo é o sítio predominante da replicação viral. Os enterovírus são, na realidade, agentes etiológicos reconhecidos por causar poliomielite paralítica, meningite asséptica, miocardite, conjuntivite hemorrágica aguda e doença de mãos-pés e boca, além de uma série de outras síndromes de localização extra-intestinal (da Silva et al. 2005).

A história dos enterovírus está intimamente relacionada à história dos poliovírus. O poliovírus é o protótipo dos enterovírus mais estudado no ramo da virologia molecular e forneceu informação importante sobre a biologia dos Picornavírus. A síndrome poliomiélica, doença muito antiga, era já bem conhecida centenas de anos antes de os poliovírus serem isolados pela primeira vez. Pleurodinia, miocardite e herpangina foram descritas na segunda metade do século XIX e no início do século XX, muitos anos antes dos coxsackievírus serem descobertos. O aparecimento do “exantema de Boston”, em 1954, levou à identificação de um novo enterovírus, o coxsackievírus A16. Durante uma pandemia de conjuntivite hemorrágica aguda que se espalhou a partir da África e Sudoeste da Ásia, de 1969 a 1973, um novo agente viral, o enterovírus 70, foi identificado. Epidemias subsequentes mostraram que uma “variante” antigênica de coxsackievírus A24, como agente etiológico de conjuntivite hemorrágica aguda, doença altamente contagiosa (Pallansch e Roos, 2001).

A propagação de poliovírus em monocamadas de células, de origem não-neural, de mamífero, demonstrada em 1949, por Enders et al., representou um enorme avanço no estudo não só dos enterovírus mas da virologia como um todo, pois marcou o nascimento da cultura celular moderna. Este fato propiciou o isolamento de vários agentes virais, bem como o desenvolvimento de vacinas (inativada e atenuada) contra a poliomiélie. Este trabalho

pioneiro rendeu a estes autores o prêmio Nobel de medicina em 1954 (White e Fenner, 1994). E com base no cultivo viral em cultura celular foram desenvolvidas as vacinas anti-pólio inativada e atenuada, por Jonas Salk em 1954 e Albert Sabin em 1961, respectivamente (Rotbart, 1995).

## **1.2 Epidemiologia dos Enterovírus humanos**

Os enterovírus de origem humana têm o homem como único reservatório e hospedeiro natural, e o contato direto pessoa-a-pessoa parece ser a principal via de disseminação. Os vírus podem ser encontrados na orofaringe e intestino de indivíduos com infecção sintomática ou assintomática. Nas fezes, os enterovírus geralmente permanecem e são excretados por um longo período (até por mais de um mês) do que em secreções do trato respiratório superior. Os vírus também podem estar presentes em aerossóis, provenientes de tosse ou espirro (Melnick, 1985).

A epidemiologia dos enterovírus constitui uma janela para o entendimento não apenas das doenças clínicas causadas por estes agentes, mas também, da variação genética, patogenia e oportunidade de prevenção. Apesar de os enterovírus possuírem distribuição universal, vários fatores incluindo: idade, sexo e condições socioeconômicas têm efeitos previsíveis na dinâmica das infecções (da Silva et al. 2005).

Um dos determinantes mais importantes da infecção por enterovírus é a idade. Sendo que diferentes grupos etários apresentam diferentes susceptibilidades à infecção, gravidade da doença, manifestações clínicas (Moore e Morens, 1984).

Os enterovírus são mais prevalentes entre pessoas de nível socioeconômico mais baixo, em aglomerados populacionais onde as condições de higiene e saúde são precárias (Rotbart, 1995).

Os enterovírus podem ser encontrados nos dejetos humanos pela eliminação de material fecal contaminado, mesmo em períodos de infecção assintomática, servindo de fonte de contaminação a reservatórios de água potável ou de irrigação. A concentração de partículas virais presentes nos reservatórios é variável, mas também depende do nível de higiene da população e da prevalência da infecção na comunidade. A estação do ano também é um fator, como visto em países de clima temperado (Melnick, 1985; Ehlers et al. 2005).

A maior quantidade e a duração da eliminação do vírus ocorrem nas infecções primárias. A maioria dessas infecções ocorre durante a infância. Por esta razão, as crianças

provavelmente, são os transmissores mais importantes dos enterovírus, particularmente dentro das famílias. E a maior exposição das crianças ao vírus durante a infecção pode torná-las mais propensas a terem sintomas clínicos mais significativos (Pallansch e Roos, 2001).

As doenças provocadas por estes agentes acometem mais frequentemente os homens do que as mulheres, embora algumas exceções tenham sido descritas. As infecções são mais evidentes entre indivíduos de baixas condições socioeconômicas e entre aqueles que vivem em áreas urbanas (Pallansch e Roos, 2001; da Silva et al. 2005).

Um conceito importante para compreender a epidemiologia dos enterovírus é a variação: por sorotipo, pelo clima, pela localização geográfica e pela doença. Os surtos podem ser restritos a pequenos grupos, como escolas e creches ou comunidades selecionadas, ou podem tornar-se generalizados em relação a região, nacional ou mesmo mundial. Surtos em pequenos grupos, às vezes, pode ser epidemiologicamente ligado a condições higiênicas precárias. (Pallansch e Roos, 2001).

### **1.3 Modo de transmissão dos Enterovírus humanos**

A transmissão ocorre principalmente por contato direto pessoa a pessoa, pela via entérica sendo os alimentos e água contaminada com fezes a principal entrada do vírus. O mesmo pode ocorrer pela via oral-oral, através de gotículas de secreções da orofaringe (ao falar, tossir ou espirrar). As más condições habitacionais, a higiene pessoal precária e o elevado número de crianças numa mesma habitação constituem fatores que favorecem a transmissão dos enterovírus (da Silva et al. 2005; MS, 2009).

### **1.4 Período de transmissibilidade dos Enterovírus humanos**

Não se conhece com exatidão, o período de transmissão do vírus, mas pode iniciar-se antes do surgimento das manifestações clínicas. O vírus pode ser encontrado nas secreções da orofaringe após 36 a 72 horas da instalação da infecção. Em indivíduos infectados, a eliminação do vírus pela orofaringe persiste por um período de aproximadamente uma semana e nas fezes por 3 a 6 semanas, enquanto que nos indivíduos reinfectados a eliminação do vírus se faz por períodos mais reduzidos (Pallansch e Roos, 2001; MS, 2009).

### **1.5 Características clínicas de infecção pelos Enterovírus humanos**

A maioria das infecções por enterovírus caracteriza-se por cursar de forma assintomática, mas algumas vezes com infecções que podem ser graves ou fatais (1-2% dos casos). Essas manifestações estão relacionadas a diversos fatores tais como: o sorotipo viral e sua virulência, a dose infectante, o tropismo por determinado tecido ou órgão, a idade, o sexo, a porta de entrada, ao estado imune (da Silva et al. 2005).

### **1.6 Controle e tratamento de infecções por Enterovírus humanos**

No que diz respeito aos enterovírus humanos, existem vacinas disponíveis somente para a prevenção da poliomielite, uma preparada com vírus atenuado e a outra com vírus inativado. De um modo geral, a quarentena de pacientes ou seus contactantes não é um procedimento eficaz no controle da disseminação dos vírus, devido ao seu modo de transmissão (Gonçalves et al. 2008).

Para certos enterovírus, algum controle pode ser conseguido com cuidados higiênicos dos pacientes, de seus contactantes e dos profissionais que compõe a equipe hospitalar. Para a prevenção de surtos, é importante a melhoria das condições de saneamento básico, de forma a prevenir a contaminação de águas utilizadas para o consumo ou lazer. Não existem antivirais eficientes para o controle ou tratamento de doenças induzidas pelos enterovírus. A maioria dos doentes recupera-se naturalmente (Pallansch e Roos, 2001; Gonçalves et al. 2008).

### **1.7 Diagnóstico laboratorial dos Enterovírus humanos**

Devido à diversidade de respostas dos hospedeiros aos enterovírus, aliada ao grande número de sorotipos, bem como ao seu hábitat principal (trato respiratório superior ou trato gastrointestinal), o diagnóstico envolve tanto aspectos clínicos como epidemiológicos. O diagnóstico laboratorial dos enterovírus assumiu grande importância em face da gravidade dos quadros clínicos associados a alguns vírus desse gênero, como os poliovírus (Gonçalves et al. 2008).

A maioria dos enterovírus humanos são citopatogênicos. O diagnóstico dos enterovírus pode ser realizado por várias técnicas, mas o padrão recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é baseado no isolamento viral em cultivos celulares, já que a maioria dos vírus pertencentes ao gênero *Enterovirus* podem ser cultiváveis nestes sistemas. Apesar de bastante sensível, o resultado de um isolamento viral leva, em média, de 7 a 28 dias, para ser

concluído. A vantagem é a obtenção do agente viral para que o mesmo possa ser sorotipado para fins clínicos ou epidemiológicos (WHO, 2004).

Quando as amostras clínicas são inoculadas em culturas celulares, os vírus presentes modificam o metabolismo celular, alterando suas características morfológicas, resultado em um efeito citopático característico. O agente viral isolado pode ser posteriormente identificado de diversas maneiras, sendo a mais comum a utilização de técnicas de soroneutralização com soros imunes específicos, além de técnicas moleculares como a reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase “RT-PCR”. A introdução das técnicas de amplificação do genoma viral através de PCR veio a oferecer maior sensibilidade, especificidade e rapidez na detecção de enterovírus a partir de amostras clínicas, aumentando assim a possibilidade de se detectar sorotipos de vírus que não são isolados nos cultivos celulares mais comuns (da Silva et al. 2005).

O processo de diagnóstico de uma infecção por enterovírus pode ser complicado. Este problema resulta da biologia e epidemiologia da infecção por estes vírus, bem como a partir de limitações nas atuais metodologias de diagnóstico. Embora seja possível demonstrar que uma pessoa está infectada por um enterovírus, esta associação não prova necessariamente a causa da doença. Por outro lado, um diagnóstico presuntivo em certas situações epidemiológicas e clínicas pode ser possível com um elevado grau de certeza por motivos clínicos, como por exemplo, no caso das paralisias flácidas agudas provocadas por poliovírus; doença de mão, pé e boca causada por coxsackievírus (Pallansch e Roos, 2001).

### **1.8 Etiologia das infecções por Enterovírus humanos**

A maioria das infecções por enterovírus são assintomáticas, há estimativas de até 5-10 milhões de infecções sintomáticas por enterovírus a cada ano nos Estados Unidos, resultando em 30.000 a 50.000 hospitalizações por ano. A maioria das infecções não causa doença significativa, mas a infecção pode conduzir a uma doença grave, especialmente em crianças e pessoas imunocomprometidas. Além disso, este grupo de vírus é a causa mais comum de meningite asséptica, a infecção mais frequente do sistema nervoso central. Os enterovírus têm sido implicados em doenças crônicas, bem como agudas (Pallansch e Roos, 2001; Khetsuriani et al. 2003; CDC, 2006).

### 1.9 Classificação taxonômica dos Enterovírus humanos

O termo “Picornavírus” foi criado por volta de 1963 para se aplicar a um número crescente de pequenos vírus icosaédricos com genoma de RNA, que compartilhavam um conjunto de características físicas e biofísicas. O nome acabou por ser utilizado como a base para o nome da família, *Picornaviridae*, quando a família foi reconhecida nos primeiros trabalhos pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* “ICTV” (Wildy, 1971).

Segundo a classificação taxonômica atual dos vírus, oficializada no ICTV 2011, os Enterovírus humanos são membros do gênero *Enterovirus* que pertencem à família *Picornaviridae*, ordem *Picornavirales* (*pico* = pequeno; *rna* = ácido ribonucléico) (*Picornaviridae Homepage*). Estes vírus foram inicialmente identificados e classificados com base nas suas características morfológicas e antigênicas, verificadas em testes de neutralização com antisoros específicos para esses vírus (King et al. 2000).

Atualmente, a família *Picornaviridae* compreende 12 gêneros: *Enterovirus* (10 espécies), *Aphthovirus* (4 espécies), *Avihepatovirus* (1 espécie), *Cardiovirus* (2 espécies), *Erbovirus* (1 espécie), *Hepatovirus* (1 espécie), *Kobuvirus* (2 espécies), *Parechovirus* (2 espécies), *Sapelovirus* (3 espécies), *Senecavirus* (1 espécie), *Teschovirus* (1 espécie) e *Tremovirus* (1 espécie), sendo que todos estes gêneros são formados por agentes virais que possuem a capacidade de infectar vertebrados (Knowles et al. 2011).

Dentro do gênero *Enterovirus*, existem vírus com a capacidade de infectar o homem. São eles denominados enterovírus humanos, que foram inicialmente classificados em: Coxsackievírus grupo A - 23 tipos (A1-A22, A24); Coxsackievírus do grupo B - 6 tipos (B1 a B6), Echovírus – 31 tipos (1-9, 11-27, 29-33), Poliovírus - 3 tipos (1-3) e os Enterovírus 68 a 72 (Pallansch e Roos 2001; da Silva et al. 2005).

A comparação de sequências da região 3' NC do genoma junto com a análise filogenética do gene da proteína VP1, dos enterovírus humanos permitiu que eles fossem classificados em quatro espécies, designadas de Enterovírus humano A, B, C e D (Oberste et al. 1999). Estes achados baseados em experimentos moleculares permitiram a análise completa do genoma viral, bem como a classificação atual dos enterovírus humanos (King et al. 2000; Norder et al. 2003; Oberste et al. 2004; Oberste et al. 2005; Knowles et al. 2011). A **Tabela 1.1** mostra a atual classificação dos enterovírus humanos baseada na análise filogenética de diferentes genomas virais.

**Tabela 1.1 – Classificação dos Enterovírus humanos baseada na análise filogenética do genoma viral.**

<b>Enterovírus humanos A (HEV-A)</b>	<b>Enterovírus humanos B (HEV-B)</b>	<b>Enterovírus humanos C (HEV-C)</b>	<b>Enterovírus humanos D (HEV-D)</b>
Coxsackievírus CVA2 - A8	Coxsackievírus CVB1 - B6	Poliovírus PV1 – 3	Enterovírus EVD68
CVA10	SVDV	Coxsackievírus CVA1	EVD70
CVA12	CVA9	CVA11(incl. CVA15)	EVD94
CVA14	Echovírus E1 (incl. E8)	CVA13 (incl. CVA18)	EVD111
CVA16	E2 - E7	CVA17	EVD120
Enterovírus A EVA71	E9 (incl. CVA23)	CVA19 - A22	EV68 (incl. HRV87)
EVA76	E11 - E21	CVA24	
EVA89 - A92	E24 - E27	Enterovírus C EVC95 - C96	
EVA114	E29 - E33	EVC99	
EVA119	Enterovírus B EVB69	EVC102	
SV19	EVB73 - B75	EVC104 - C105	
SV43	EVB77 – B88	EVC109	
SV46	EVB93	EVC113	
EVA 13 (incl. BA13)	EVB97 - B98	EVC116 - C118	
	EVB100 - B101		
	EVB106 - B107		
	EVB110		
	SA5		

Legenda: CVA – coxsackievírus A; CVB – coxsackievírus B; E – echovírus; EV - enterovírus; PV – poliovírus; SVA = Simian enterovírus; HVR = Rhinovírus humanos. Fonte: Adaptado de *Picornaviridae Homepage*.

### **1.10 Estrutura dos Enterovírus humanos**

O poliovírus foi o primeiro enterovírus a ser reconhecido, embora sua caracterização como tal só tenha acontecido 50 anos após a sua descoberta. É, possivelmente, o mais bem conhecido de todos os vírus de seu gênero e serve de molde para todos os outros vírus (Wimmer et al. 1993; Melnick, 1996).

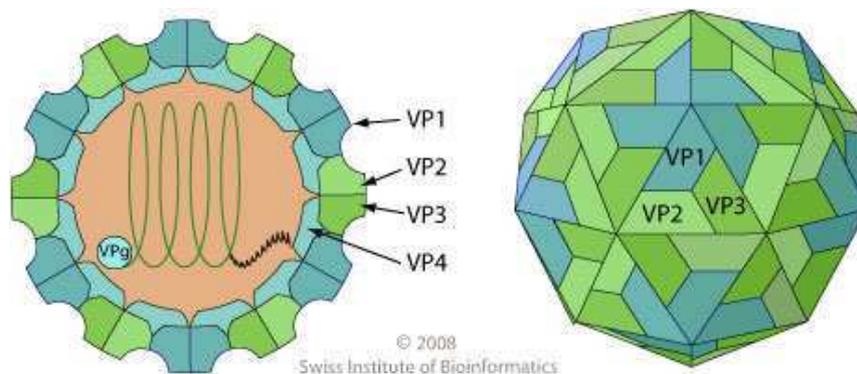
Os enterovírus possuem uma estrutura genômica composta por um RNA de fita simples, de polaridade positiva, com um peso molecular de cerca de  $2,6 \times 10^6$  daltons (aproximadamente 7500 nucleotídios). O RNA genômico é o próprio RNA mensageiro, portanto infectante, poliadenilado na extremidade 3'NC. E carrega uma pequena proteína, VPg “Virion Protein genome”, covalentemente ligada em sua extremidade 5'NC. São vírus

pequenos, medindo aproximadamente 30 nm de diâmetro, esféricos, e não possuem envelope (Racaniello, 1988; Rueckert, 1996; Oxman, 1999).

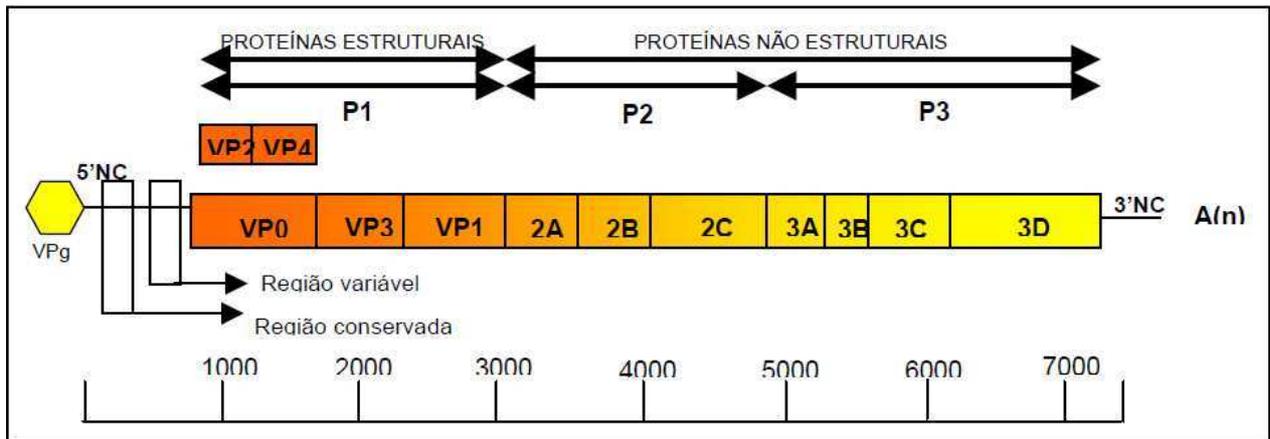
O RNA desses vírus contém uma única fase de leitura aberta que codifica uma poliproteína, que é clivada para produzir as proteínas virais (estruturais e não estruturais) importante para a replicação. As clivagens são realizadas por proteínas codificadas pelo próprio vírus, gerando diversos produtos protéicos com diferentes funções, como as proteínas do capsídeo, proteinase e RNA polimerase. O capsídeo tem simetria icosaédrica, composto de 60 subunidades idênticas (protômeros), constituídos de 4 polipeptídeos ou proteínas, denominadas: VP1, VP2, VP3 e VP4, que são produtos de reações proteolíticas do segmento P1 (Racaniello, 1988; Rotbart, 1995; Oxman, 1999).

As proteínas VP1, VP2 e VP3 estão expostas na superfície do vírion, enquanto que VP4 fica mais internalizada e está associada ao RNA viral. Desta forma, os epítomos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes estão localizados principalmente na VP1, que é a proteína mais exposta, e também em VP2 e VP3 (Hogle et al. 1985).

A **Figura 1.1**, ilustra o capsídeo viral de um enterovírus e a localização de suas proteínas estruturais. A **Figura 1.2**, mostra a localização, no genoma dos enterovírus, dos genes que são traduzidos nas proteínas supracitadas.



**Figura 1.1.** Esquemas ilustrativos do capsídeo de enterovírus com as proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4. Fonte: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/97.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html) (acesso em 01/04/12). Esquema do capsídeo de um enterovírus, mostrando a disposição externa da VP1, VP2 e VP3 em um protômero; e VP4 no interior do capsídeo.



**Figura 1.2. Esquema do genoma dos Enterovírus.** Fonte: Costa (1999) adaptado por Santos (2005). Esquema do genoma dos enterovírus, mostrando a disposição da proteína VPg, região 3' e 5'NC, proteínas estruturais e não estruturais.

### 1.11 Características físico-químicas dos Enterovírus humanos

Os enterovírus são inativados por vários agentes físicos e químicos. Estes vírus podem ser inativados pela luz ultravioleta, formaldeído a 0,3 %, ácidos fortes, cloro residual livre (0,3 a 0,5 ppm), HCl (0,1 N) e pelo calor (50 °C/60 minutos), proporcionando uma rápida inativação. Os enterovírus humanos são resistentes enzimas proteolíticas e desinfetantes de uso comum (como etanol 70 %, isopropanol e sais de amônio quaternário) e solventes orgânicos (clorofórmio, éter). Estes vírus são estáveis, em culturas celulares, por muitos anos a baixas temperaturas (-70 °C), por semanas quando a 4 °C e por dias a temperatura ambiente (Moore e Morens, 1984; Melnick, 1996).

### 1.12 Distribuição geográfica dos Enterovírus humanos

Os enterovírus humanos têm uma distribuição mundial. O padrão epidemiológico varia conforme a região geográfica e as condições climáticas, mas a incidência de infecção é maior nos meses de verão e outono nos locais de clima temperado e durante todo o ano em locais de clima tropical (Saywer, 1999; WHO, 2000).

### 1.13 Ciclo replicativo dos Enterovírus humanos

O ciclo replicativo dos picornavírus ocorre na sua totalidade no citoplasma da célula hospedeira. O ciclo inicia no momento em que ocorre a interação entre o vírus e a célula, com a adsorção do vírion a receptores celulares específicos presentes na membrana plasmática da célula (Racaniello, 2001; Pallansch e Roos, 2001).

Logo após a adsorção, o vírus é internalizado por endocitose, em alguns pontos da superfície celular revestidos por clatrin, onde os receptores estão concentrados. Ocorre a invaginação e a posterior formação de vesículas e o vírus perde seu capsídeo, no interior da célula hospedeira. No interior das vesículas, ocorre a acidificação devido à atuação da bomba de prótons, que provoca mudanças na estrutura do vírion, resultando na liberação de VP4 e no aparecimento de sítios hidrofóbicos presentes na região aminoterminal da proteína do capsídeo VP1, ambos escondidos anteriormente na região interna do capsídeo viral (Pallansch e Roos, 2001).

A fusão da membrana lipídica com os sítios hidrofóbicos de VP1 permite a formação de poro e a conseqüente transferência do RNA do vírion para o citosol, onde ocorre a sua replicação. A proteína VPg é então removida do RNA viral por enzimas celulares (Pallansch e Roos, 2001). O RNA, age como RNA mensageiro (RNAm), que é automaticamente traduzido, sem interrupção em uma única poliproteína, que ainda no processo de formação, é clivada autocataliticamente nos intermediários P1, P2 e P3 (Rueckert, 1996; Murray e Barton, 2003).

O processamento da poliproteína precursora é realizado cotransducionalmente por reações intramoleculares (*in cis*), as quais são chamadas de clivagens primárias, seguidas pelo processamento secundário por reações intermoleculares (*in cis* ou *in trans*). A seqüência de clivagens é a liberação do precursor P1 da poliproteína que surge pela protease 2A<sup>pro</sup>. A 2A<sup>pro</sup> é libertada da poliproteína por clivagem cotransducional na sua terminação amino (Baltimore e Girard, 1996; Murray e Barton, 2003).

Esta clivagem é um pré-requisito para o processamento proteolítico da região precursora do capsídeo. O precursor P1 é clivado para produzir, inicialmente, VP0, VP1 e VP3 e, por fim, as quatro proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4 (**Figura 1.3**). A região P2 codifica três proteínas, incluindo uma com atividade de protease, enquanto que a região P3 codifica quatro proteínas, incluindo a RNA polimerase, que é RNA-dependente e necessária para a replicação do RNA (Baltimore, 1969; Baltimore e Girard, 1996).

Estudos sobre o processo de tradução dos vírus da família *Picornaviridae* demonstraram a presença, na região 5' NC do genoma viral, de uma seqüência correspondente

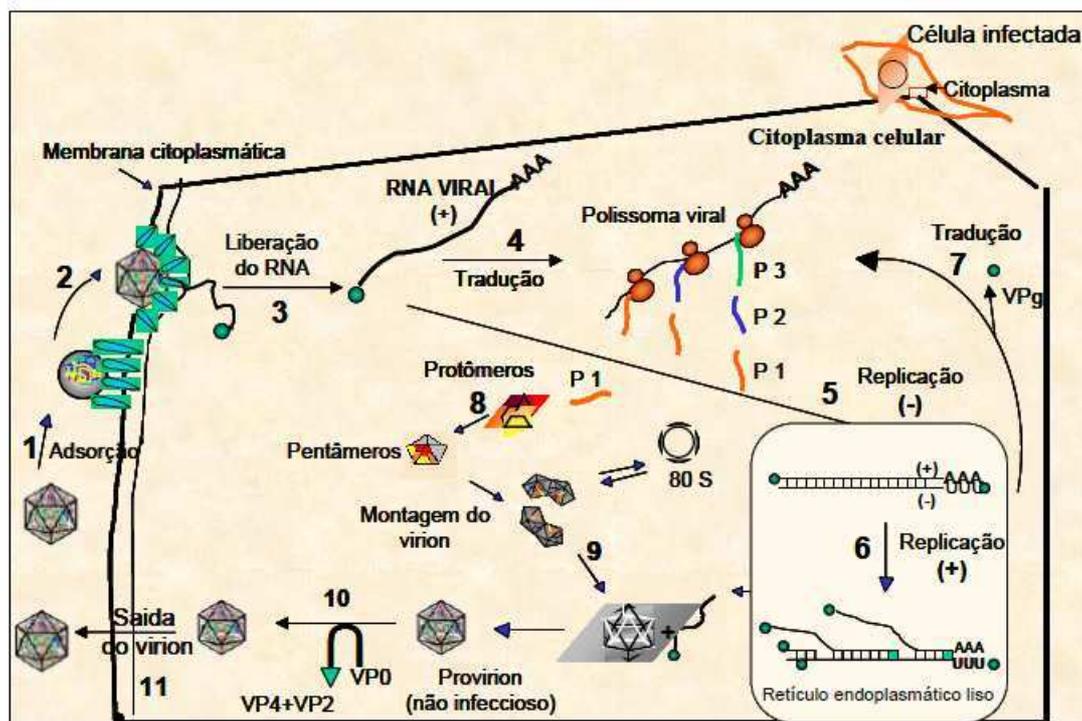
a um sítio interno de entrada no ribossoma, responsável por direcionar a tradução. O sítio interno de entrada no ribossoma “IRES”, região muito conservada permite o início da tradução viral e a inibição da tradução normal das proteínas da célula hospedeira. A subunidade 40S ribossomal liga-se ao RNAm através do “IRES” no códon de iniciação AUG (Racaniello, 2001).

A síntese do genoma viral é obtida por uma série de eventos onde participam as moléculas molde RNA viral, as RNA polimerases codificadas pelos vírus, além de outras proteínas virais e celulares. Todo esse processo ocorre no interior do citoplasma, fortemente associado ao retículo endoplasmático liso (Pallansch e Roos, 2001).

O evento inicial na replicação do RNA viral é copiar o RNA genômico para formar uma fita complementar de polaridade negativa, a qual servirá de molde para a síntese de novas fitas de polaridade positiva. A síntese da fita complementar é iniciada na extremidade 3' NC do genoma viral e utiliza a proteína VPg como um iniciador “primer”. A partir de uma fita complementar de polaridade negativa, várias fitas nascentes de RNA com polaridade positiva são transcritas simultaneamente pela RNA polimerase viral, formando o chamado intermediário replicativo (Rueckert, 1996; Racaniello, 2001; Murray e Barton, 2003).

No início da replicação, parte do RNA positivo retorna ao citoplasma para a tradução de mais proteínas, enquanto outra parte permanece no retículo endoplasmático liso para a formação de mais centros de replicação de fita positiva. Posteriormente, as fitas positivas de RNA são acumuladas até serem empacotadas nos capsídeos. As partículas completas são libertadas pela desintegração da célula hospedeira (Rueckert, 1996). A **Figura 1.3** esquematiza este processo replicativo viral.

A duração de um ciclo de replicação, desde a infecção da célula até a libertação do vírus, geralmente é de 5 a 10 horas, dependendo de alguns fatores, como: pH, temperatura, sorotipo do vírus, dose infectante e estado nutricional da célula hospedeira (Moore e Morens, 1984).



**Figura 1.3. Ciclo replicativo dos Enterovírus.** Fonte: Rueckert, 1985 adaptado por Costa (1999). 1. Adsorção; 2. Endocitose; 3. Liberação do RNA viral; 4. Tradução; 5,6. Replicação; 7. Tradução para novas poliproteínas; 9,10. Empacotamento do virion e 11. Saida do víron.

#### 1.14 Características antigênicas dos Enterovírus humanos

Os epítomos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes estão localizados nas três proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3), as quais constituem a superfície viral, sendo a maioria deles agrupados em VP1, que é a proteína mais externa (Hogle et al. 1985) sendo a principal proteína utilizada para estudos de epidemiologia molecular dos enterovírus. As infecções pelos enterovírus são geralmente seguidas por uma boa resposta imunológica por parte do hospedeiro. A imunidade é tipo-específica, e por isso mesmo um indivíduo pode apresentar, durante a vida, sucessivas infecções por diferentes tipos sorológicos do vírus (Minor et al. 1990; da Silva et al. 2005).

Dentro de um único sorotipo, pequenas diferenças antigênicas podem ocorrer entre diferentes isolados. Esse fenômeno foi observado tanto em relação aos poliovírus quanto a outros enterovírus. A frequência de mutação para muitos enterovírus é da ordem de 1 por 10.000 vírions formados. A consequência é o aparecimento de uma amostra pouco neutralizada pelo soro imune produzido contra a cepa original, mas que induz à produção de anticorpos (Minor, 1990; Minor et al. 1990).

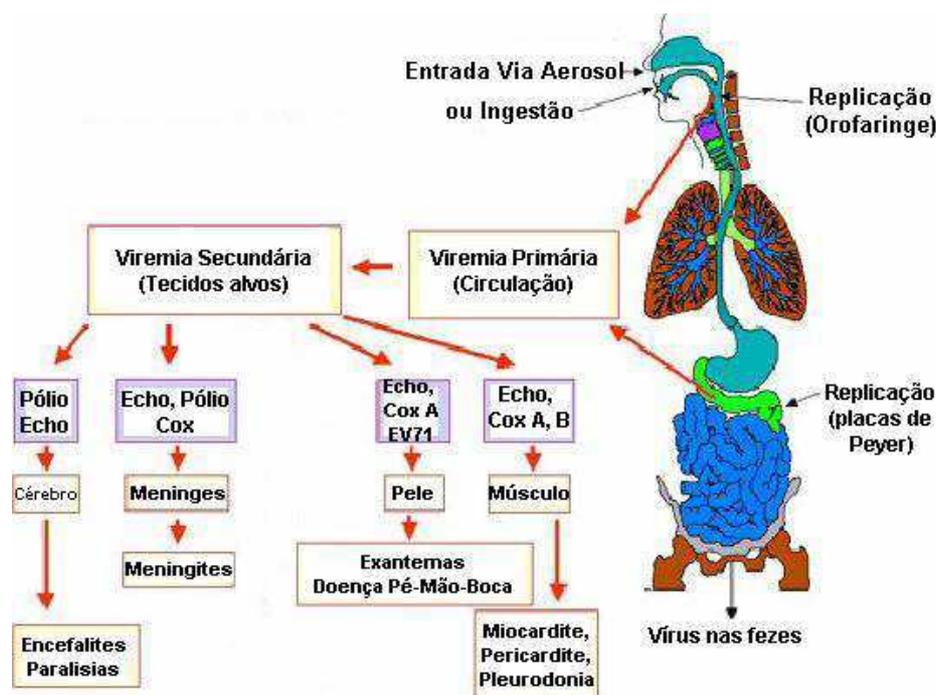
### 1.15 Patogenia e imunidade dos Enterovírus humanos

A patogenia das infecções pelos enterovírus, de uma forma geral pode ser inferida através do conhecimento a respeito dos poliovírus, o agente viral mais bem estudado de entre os enterovírus. A porta de entrada para a maioria dos enterovírus é, presumivelmente, o trato alimentar e o trato respiratório superior, mais especificamente a orofaringe. No entanto, alguns enterovírus possuem outras rotas de infecção, as quais podem estar associadas ao tipo de doença que estes causam. Por exemplo, coxsackievírus A21, o principal enterovírus causador de infecção respiratória, se propaga pela via intranasal ou aerossol através de secreção contaminada. Além disso, o enterovírus 70 e o coxsackievírus A24v, que causam conjuntivite hemorrágica aguda, se propagam por meio de secreções oculares ou materiais contaminados (Pallansch e Roos, 2001; da Silva et al. 2005).

Após sua entrada no hospedeiro, há uma replicação viral contínua, que provavelmente ocorre no tecido linfóide da laringe e do intestino, podendo ocorrer a viremia e os vírus atingirem as células do sistema reticuloendotelial e dos órgãos alvos específicos: medula espinhal, cérebro, meninges, miocárdio e pele (Melnick, 1985). Contudo em alguns sítios de implantação da infecção (amídalas, linfonodos da orofaringe e dos intestinos), pode haver uma disseminação sistêmica, com a ocorrência de uma viremia transitória, que pode resultar na replicação viral em localizações secundárias como o Sistema Nervoso, tanto o Central (SNC) como o Periférico (SNP) e o coração (Pallansch e Roos, 2001).

O período de incubação das infecções causadas por estes vírus pode levar dependendo do sorotipo do vírus e do quadro clínico a ele associado, de 12 horas a 35 dias. Os vírus são excretados nas fezes por até dois meses após a infecção, e estão presentes na faringe por uma ou duas semanas após a infecção. Isto ocorre tanto nos indivíduos com sintomas como nos assintomáticos (Moore e Morens, 1984). A **Figura 1.4** mostra a patogenia dos enterovírus esquematizada no Homem.

A resposta imune nas infecções pelos enterovírus é tipo-específica e duradora. A resposta humoral é especialmente importante. Isto é demonstrado por dois fatores: a ocorrência de infecções persistentes (crônicas) em pacientes com quadros de hipogamaglobulinemia e a gravidade das doenças causadas pelos enterovírus em crianças recém-nascidas (da Silva et al. 2005).



**Figura 1.4. Patogênese da infecção pelos Enterovírus no Homem.**

(Fonte: <http://pathmicro.med.sc.edu/spanish-virology/spanish-chapter10-1.htm>; acesso em 01/04/12). A principal via de transmissão é oral-fecal por ingestão; ou via respiratória por aerossol; seguido de uma rápida multiplicação na orofaringe, e posteriormente nas placas de peyer antes migrar para a corrente sanguínea e a órgãos alvos ou ser excretado nas fezes.

### 1.16 Doenças causadas pelos Enterovírus humanos

Muitas doenças que são agora definidas como causadas pelos enterovírus eram já conhecidas e foram descritas muito tempo antes desses agentes virais serem identificados. Entre os enterovírus, os sorotipos mais virulentos do gênero, são responsabilizados por induzirem um grande percentual de 90 a 95% para os poliovírus e 50% para os echovírus e coxsackievírus, de infecções assintomáticas. As manifestações clínicas, quando ocorrem, variam desde as graves, por vezes fatais à uma doença febril indiferenciada. Contudo, diferentes enterovírus podem produzir a mesma síndrome (Melnick, 1985).

As doenças mais comuns associadas aos diferentes grupos de enterovírus são:

**Meningite e encefalite:** A inflamação da meninge, membrana que reveste o cérebro e a medula, é uma das manifestações mais comuns das infecções virais que acometem o SNC, e os enterovírus são responsáveis por mais de 80% de todos os casos (Rotbart, 1998; Pallansch e Roos, 2001). Os sintomas mais comuns, que ocorrem em graus variados, são: febre, dor de

cabeça, irritabilidade, náuseas, vômitos, rigidez de nuca, exantema ou fraqueza nas últimas 36 horas que antecedem o início dos sintomas, confusão mental, descerebração e ataxia cerebral. Os principais enterovírus que têm sido isolados a partir de casos de meningite e encefalites são: Cocksackievírus B5; Echovírus sorotipos 4, 6, 9, 11 e 30; Enterovírus 71, e Cocksackievírus do grupo A (Rotbart, 1995; Melnick, 1996).

**Infecção respiratória:** As infecções do trato respiratório causadas pelos enterovírus são bastante comuns, mas geralmente brandas. Diferentes sorotipos têm sido associados a uma grande variedade de sinais e sintomas relacionados ao trato superior e inferior. Com exceção da pleurodinia, as infecções do trato respiratório superior, causadas por enterovírus, são distinguidas daquelas causadas por adenovírus, coronavírus e rinovírus. Estas infecções incluem: resfriado comum, otite média, faringite, laringite, crupe, bronquite, bronquiolite, pneumonia, herpangina e pleurodinia (Moore e Morens, 1984; Chonmaitree e Mann, 1995).

**Herpangina:** A infecção é autolimitada e predominante na infância, ocorrendo especialmente em crianças menores de 12 anos. É uma doença febril aguda relativamente comum caracterizada pela presença de lesões papulares, vesiculares e ulcerativas nas amígdalas, irritabilidade, anorexia, dor de garganta, dor de cabeça, dores musculares, diarreia e coriza. Os principais enterovírus que têm sido isolados a partir de casos são: Cocksackievírus A e B, e Echovírus (Moore e Morens, 1984; Melnick, 1985).

**Pleurodinia:** É uma doença que ocorre de forma epidêmica ou esporádica sendo caracterizada por ser uma doença febril aguda com mialgia. Os agentes etiológicos mais implicados nestes casos são: Cocksackievírus B3 e B5, ainda que outros enterovírus já tenham sido identificados (Dalldorf e Melnick, 1965; Pallansch e Roos, 2001).

**Doenças exantemáticas:** A síndrome exantemática, geralmente associada aos Enterovírus 71 e Cocksackievírus A16, é a “doença de mãos-pés e boca”. As crianças, na faixa etária de 1 a 5 anos, são o principal grupo de risco. O quadro clínico típico é caracterizado pela febre moderada, seguida do aparecimento de múltiplas lesões maculares avermelhadas e discretas. Estas lesões estão localizadas na palma das mãos, sola dos pés, superfície ventral dos dedos das mãos e dos pés e nádegas (Moore e Morens, 1984; da Silva et al. 2005). Rash vesicular constituem uma manifestação comum dos enterovírus. Essas manifestações possuem um curso transitório. Os Echovírus 9 e 16; são geralmente identificados nestes casos (Melnick, 1994; da Silva et al. 2005).

**Doença febril aguda inespecífica:** Os enterovírus não-pólio constituem a causa comum de doenças febris sem causa aparente. A febre é, muitas das vezes, o único sintoma,

enquanto que algumas crianças podem apresentar: irritabilidade, vômito, diarreia, exantemas, sinais de infecção respiratória superior e meningite asséptica (Pallansch e Roos, 2001; da Silva et al. 2005).

**Doenças cardíacas (Miopericardite):** Os enterovírus são responsáveis por cerca de 30 a 50% de todos os casos de miocardite aguda, que ocorrem de forma esporádica e quase na totalidade reportados durante epidemias. A natureza cardiomiotrópica dos Coxsackievírus do grupo B tem sido descrita desde a sua descoberta como um dos responsáveis por tais miocardites. Dois terços dos pacientes apresentam sinais de: infecção febril e do sistema respiratório superior que precedem a miocardite fraca que pode incluir febre, dor torácica, taquicardia e dispnéia (Moore et al. 1984; da Silva et al. 2005).

**Conjuntivite hemorrágica aguda e outras conjuntivites:** A conjuntivite hemorrágica é uma das manifestações mais peculiares dentre todas as síndromes enterovirais humanas. O período de incubação é curto (12 a 48 horas) e precede um súbito desenvolvimento uni ou biocular de irritação, sensação de corpo estranho, ardência, dor, vermelhidão, lacrimejamento e inchaço periorbital. E os sintomas desaparecem entre 7 a 10 dias. Os agentes etiológicos implicados nestes casos são: Enterovírus 70 e Coxsackievírus A24 (CA24v) (Yamazaki et al. 1995; da Silva et al. 2005). Os outros sorotipos têm sido ocasionalmente reconhecidos como agentes causadores de conjuntivite não-hemoragica, incluindo os Coxsackievírus A9, A10, A16 e B5; e Echovírus sorotipos 1, 4, 6, 7, 9, 16 e 20 (da Silva et al. 2005).

**Infecções neonatais:** Os enterovírus podem ser transmitidos durante o período pré-natal (via transplacentar), durante o parto (via contaminação fecal do canal de parto), ou durante o período pós-parto até mais ou menos 10 dias do nascimento. Os Coxsackievírus do grupo B e certos Echovírus, particularmente o sorotipo 11, são responsáveis pela maioria das infecções neonatais, as quais podem ser fulminantes e muitas vezes fatais. Os sintomas mais comuns, que ocorrem em graus variados são: letargia, dificuldade de amamentação, vômito, presença ou ausência de febre, diarreia, anorexia. Pode ocorrer miopericardite, dificuldade respiratória como dispneia, e dificuldade cardíaca como taquicardia; assim como é o caso da cianose (Melnick, 1985; da Silva et al. 2005).

**Poliomielite:** É uma doença infecciosa de carácter agudo que ocorre seguida de uma infecção causada por qualquer um dos três sorotipos de Poliovírus tipos 1, 2 e 3. Em sua forma aguda, afeta o sistema nervoso central, onde destrói os neurônios motores nos cornos

anteriores da medula espinhal que resulta em paralisia flácida (Moore et al. 1984; Melnick, 1985; da Silva et al. 2005).

**Paralisia causada por enterovírus não pólio:** A manifestação clínica é similar ao da poliomielite. Após o curso prodrômico não específico de febre, que dura entre um a três dias, ocorre o começo da paralisia flácida progressiva por mais uns dois dias. Raramente se observa envolvimento bulbar e o prognóstico é melhor do que o da poliomielite, visto que a maior parte dos pacientes recupera-se completamente. Os vírus mais associados a surtos de paralisia são: os Coxsackievírus A7 e Enterovírus 71 (Moore et al. 1984; da Silva et al. 2005).

### **1.17 Isolamento dos Enterovírus humanos**

A maioria dos enterovírus que infecta humanos são citopatogênicos. O isolamento destes vírus pode ser obtido a partir de materiais clínicos como fezes, líquido cefalorraquidiano (LCR), soro, secreção nasofaríngea, urina ou material histopatológico. O isolamento pode ser realizado em cultura de células, selecionadas que permitem a replicação desses enterovírus. Várias linhagens celulares podem ser utilizadas tais como: célula de rabdomiosarcoma embrionário humano (RD), célula de carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp2C), célula originária de carcinoma epitelial de cérvix humano (HeLa), célula de rim de macaco, *Cercopithecus aethiops* (Vero) e célula normal, diplóide, oriunda de fibroblasto de pulmão humano (WI-38) (Melnick, 1996).

### **1.18 Detecção e identificação de Enterovírus humanos**

Como já mencionado, o padrão para o diagnóstico de infecções por Enterovírus em amostras clínicas é baseado no isolamento viral em cultura de células usando as linhagens celulares selecionadas por permitirem a replicação dos enterovírus (WHO, 2004).

Com o desenvolvimento de metodologias baseadas em biologia molecular, os testes de diagnóstico molecular dos vírus isolados em amostras têm como alvo sítios conservados do genoma viral, na região 5'NC do RNA. Para identificação do sorotipo viral a amplificação da região alvo do gene da proteína VP1, seguida do sequenciamento nucleotídico e análise filogenética. Estas técnicas, isolamento viral em cultura e as moleculares se complementam para a identificação dos enterovírus (Romero, 1999; Oberste et al. 1999; Oberste et al. 2000; Oberste et al. 2003).

### 1.19 Perfil de saúde da criança Moçambicana

Tomando em conta o conceito amplo de saúde, preconizado pela OMS, que implica, não apenas na ausência de doenças, mas no estado de completo bem-estar físico, mental e social, podemos considerar que, apesar dos avanços registados, a garantia da saúde das crianças constitui-se ainda um grande desafio para Moçambique (MISAU, 2006).

A situação em Moçambique não difere da que é observada na Região Africana. As principais doenças que afetam as crianças são atribuídas em geral a causas preveníveis e incluem: a malária, as infecções respiratórias agudas (IRA), a diarreia, o sarampo, a anemia, a meningite, as parasitoses intestinais, a tuberculose, a desnutrição e o HIV/Sida. Os determinantes de saúde da criança constituem uma interação complexa entre vários fatores diretos e indiretos, que combinados podem afetar o estado de saúde das crianças. Entre os determinantes principais da saúde de criança destacam-se os seguintes:

**Fatores econômicos:** estão principalmente relacionados com a pobreza uma vez que esta contribui também para o fraco acesso aos serviços de saúde, à educação e a falta de capacidade monetária para pagar os serviços e/ou medicamentos.

**Fatores socioculturais:** incluem a inequidade ao acesso dos serviços sociais, ao baixo nível de educação das mães e as inadequadas práticas familiares no cuidado das crianças. Os fatores culturais principalmente ligados ao gênero têm uma grande influência na morbimortalidade neonatal e infantil em Moçambique.

**Fatores ligados ao gênero:** devido às expectativas sociais relacionadas ao gênero, a práticas e a tradições culturais, alguns pais e/ou tutores não consideram que a educação seja apropriada para as crianças do sexo feminino. Outras razões frequentes para ausência das crianças do sexo feminino nas escolas são os casamentos precoces e a gravidez. O fraco poder de decisão das mães faz com que estas não procurem os serviços de saúde em tempo hábil.

**Fatores nutricionais:** O estado nutricional das mães está relacionado ao estado de saúde da criança e tem repercussão sobre o parto e o baixo peso ao nascer, concorrendo para a desnutrição infantil.

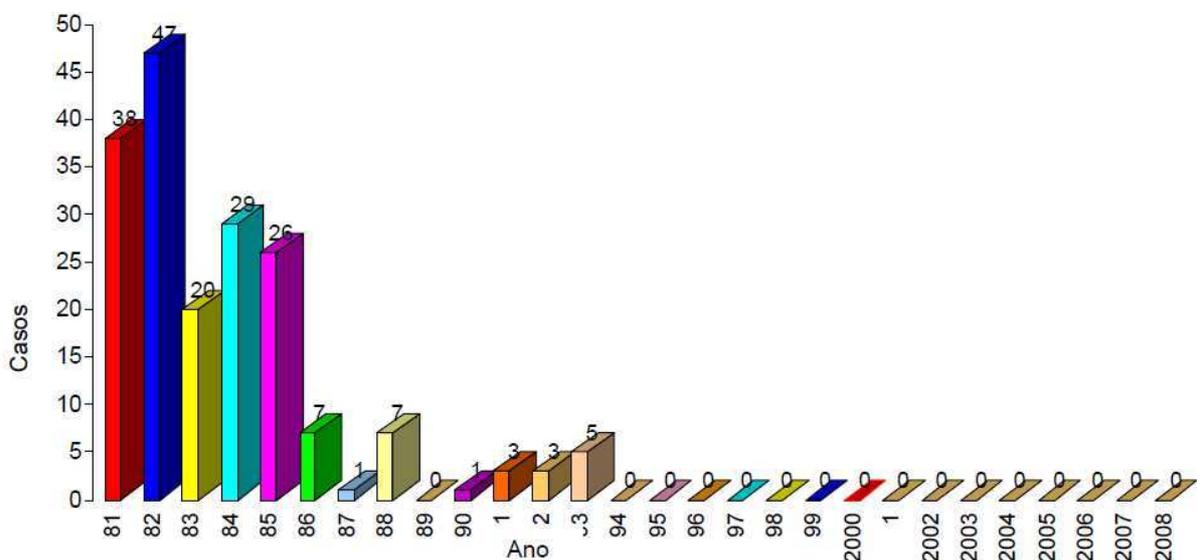
**Mortalidade materna, educação materna e pobreza:** A mortalidade materna afeta principalmente a sobrevivência das crianças. Por outro lado, em Moçambique, cerca de 68% das mulheres adultas são analfabetas o que tem influência nos hábitos culturais concorrendo para práticas nocivas e prejudiciais a saúde das crianças (MISAU, 2006).

## 1.20 Programa de vacinação contra a poliomielite em Moçambique

Moçambique participa activamente nos esforços mundiais com vista à erradicação da Poliomielite no mundo. Em 1993, a OMS criou um Grupo de Trabalho para Imunização “Task Force on Immunization” com a sigla “TFI” para acelerar a implementação destas estratégias na Região Africana. Até finais de 1998, um total de 50 países eram conhecidos como endémicos ou suspeitos de terem o vírus selvagem da Pólio em circulação, dos quais Moçambique fazia parte (MISAU, 2009).

A história da notificação dos casos de Poliomielite no país teve dois períodos distintos, nomeadamente: de 1981 a 1996, com a notificação dos casos segundo critérios clínicos e a partir de 1997, com a notificação de todos os casos de Paralisia Flácida Aguda, como medida inserida na estratégia da erradicação da poliomielite (MISAU, 2009). A **Figura 1.5** ilustra os casos de Poliomielite em Moçambique, entre 1981 – 2008.

No primeiro período, a incidência de casos de poliomielite decresceu gradualmente, atingindo a incidência mais baixa em 1986 (sete casos). Em 1989 não foram notificados casos. Os últimos casos foram notificados em 1993, sendo no total cinco.



**Figura 1.5. Casos de Poliomielite, 1981 – 2008 em Moçambique.** (Fonte: Departamento de Epidemiologia/MISAU).

Em 1996, foram elaboradas no País as normas da Vigilância da Paralisia Flácida Aguda, enfatizando-se que um caso confirmado de pólio causado pelo vírus selvagem representa uma epidemia. E com início em 1997, o segundo período foi marcado por vários acontecimentos importantes, nomeadamente: (i) introdução da Vigilância da Paralisia Flácida

Aguda, (ii) compromisso de erradicação da poliomielite e (iii) realização de campanhas de vacinação em massa em todo o país, sob o lema “Chute a Pólio para Fora de África” (MISAU, 2009).

No primeiro ano de vigilância de casos de PFA (1997), cinco casos foram notificados no país. Nos anos seguintes, o número de casos conheceu um aumento, atingindo a incidência de 81 casos em 2000, ultrapassando em 3 casos a incidência esperada para o mesmo ano. Em 2001, verificou-se uma redução do número de casos notificados. Fatores como, (i) as cheias que assolaram o centro do país e (ii) o abandono a que o programa esteve votado a nível central, devido à substituição tardia do seu responsável, teriam estado na origem desta situação. Em 2002 verificou-se novamente um aumento na incidência (88 casos), ultrapassando em 6 o número de casos esperados (MISAU, 2009).

O calendário de vacinação em Moçambique segue as normas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Uma das prioridades do Ministério da Saúde de Moçambique é a diminuição da mortalidade infanto-juvenil; para tal, conta com o Programa Alargado de Vacinação (PAV), cujo objetivo fundamental é assegurar a vacinação completa das crianças em relação às doenças alvo do programa (INE, 2009).

A estratégia atual do PAV, para a prevenção da pólio, é a administração da vacina atenuada contra poliomielite (trivalente, contendo os três sorotipos virais 1, 2 e 3). A administração é oral e consiste em três doses sendo administrada a dose zero logo ao nascimento, a primeira dose na sexta semana de vida, a segunda na décima, e a última na 14 semana de vida, além das dose de reforço nos dias nacionais de vacinação “uma vez ao ano, até completar cinco anos de idade” (INE, 2009).

### **1.21. Justificativa**

Os Enterovírus humanos são os principais responsáveis pelos casos de paralisia flácida aguda, meningite viral, doença de mão-pés e boca, acometendo indivíduos de todas as faixas etárias, principalmente crianças menores de 15 anos de idade. A sua prevalência é maior em países em via de desenvolvimento, e na população com baixo poder aquisitivo ou de renda (Hall et al. 1970; Jenista et al. 1984; Minor e Muir, 2009).

Apesar de os enterovírus humanos serem responsáveis por quadros clínicos graves, a real participação desses agentes pode ser considerada como subestimada, principalmente nos países em desenvolvimento, uma vez que o diagnóstico utiliza principalmente metodologias as quais são de alto custo monetário. Recentemente, diferentes abordagens têm sido utilizadas nos estudos da epidemiologia destes vírus, resultando em um aumento de publicações em países desenvolvidos, demonstrando a importância destes vírus.

Diversos estudos têm demonstrado a importância de se analisar a ocorrência dos enterovírus humanos na população e em ecossistemas aquáticos visando obter dados que reflitam a epidemiologia destes vírus nas populações locais. Estes estudos podem auxiliar na detecção dos vírus provenientes de indivíduos assintomáticos, propiciando dados epidemiológicos obtidos a partir de amostras não clínicas (Pallansch e Roos, 2001).

Entretanto, até ao momento, poucas pesquisas foram realizadas para se estimar a prevalência de enterovírus humanos em crianças nos países em vias de desenvolvimento. No entanto, alguns trabalhos têm focado a presença do poliovírus derivado da vacina em pacientes portadores de vírus de imunodeficiência adquirida nestes países (Pavlov et al. 2006; Manirakiza et al. 2010).

Moçambique, em 2011 registou-se dois casos de circulação de vírus da poliomielite derivado da vacina (cVDPV) sorotipo 1 (Conceição et al. 2011; MISAU, 2012). Estes achados reforçam a necessidade da vigilância epidemiológica dos poliovírus em Moçambique.

Este é o primeiro estudo epidemiológico acerca da circulação de enterovírus humanos, realizado em Moçambique. O isolamento e identificação dos enterovírus em amostras clínicas provenientes de casos e surtos são essenciais para se determinar as taxas de morbidade e de internações hospitalares associadas a infecções por estes vírus. Por outro lado, o fato de Moçambique estar a receber elevado número de imigrantes ilegais provenientes de áreas endêmicas onde tem se registrado a presença de poliovírus selvagens e derivados da vacina, reforça a necessidade de se adotar medidas de vigilância destes vírus.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Isolar e identificar os sorotipos de Enterovírus humanos circulantes, a partir de amostras de fezes de crianças menores de 15 anos com quadro compatível a infecção por enterovírus, no Hospital Geral de Mavalane na Cidade de Maputo, em Moçambique.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Realizar o isolamento viral em cultivos celulares a partir de amostras fecais de crianças menores de 15 anos com quadro compatível a infecção por enterovírus, atendidas no Hospital Geral de Mavalane.
2. Identificar os sorotipos virais isolados através de métodos moleculares (RT-PCR e Sequenciamento nucleotídico).
3. Analisar as características epidemiológicas dos pacientes, tais como idade, sexo, e características clínicas, como sinais e sintomas, a partir dos formulários de recolha de dados.
4. Correlacionar as características sociodemográficas com a positividade aos enterovírus humanos.
5. Determinar a correlação entre as características epidemiológicas e a espécie do agente viral identificado.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostras Clínicas**

Neste trabalho, foram utilizadas 178 amostras de fezes de participantes internados na pediatria do Hospital Geral de Mavalane, na Cidade de Maputo em Moçambique. Os participantes apresentavam quadro clínico compatível com infecção por Enterovírus, às idades dos participantes variaram de 0 a 180 meses. A coleta foi realizada no período de novembro de 2011 a fevereiro de 2012.

As amostras clínicas foram coletadas pelos pacientes ou responsáveis legais, diretamente no frasco ou sobre um papel ou plástico, durante o momento da evacuação e, em seguida, transferida para o frasco fornecido no âmbito do estudo.

#### **3.2 Descrição da área e população de estudo**

Moçambique está localizado na Região Austral da África. Com uma área de 752.614 km<sup>2</sup>, está limitado a norte pela Tanzânia, a noroeste pelo Malawi, a sudoeste pelo Zimbabwe, África do Sul e Swazilândia e é banhado a leste pelo Oceano Índico, em toda a extensão da sua costa de 2.470 km. Está dividido em 11 províncias: no Norte, encontram-se as províncias do Niassa, Cabo Delgado e Nampula, no Centro Tete, Manica, Zambezia e Sofala e no Sul, Inhambane, Gaza, Maputo e Maputo Cidade (MISAU, 2006).

Este estudo decorreu no Hospital Geral de Mavalane (HGM), localizado no bairro de Mavalane, na Cidade de Maputo, Moçambique. A Cidade de Maputo apresenta um clima subtropical, com duas estações distintas, sendo uma estação úmida e chuvosa entre novembro e abril e uma estação fresca e seca entre maio e outubro. O HGM faz parte dos três hospitais gerais da cidade de Maputo. A área de saúde de Mavalane é a maior da cidade e atende uma população estimada de 609.889 habitantes, cerca de 50 % da população sanitária da capital do País. Ocupa uma superfície de 168,4 km<sup>2</sup> limitada ao norte pelo distrito de Marracuene, a Sul pelo distrito urbano KaMpfumu (Ex-distrito urbano nº 1) e a Baía de Maputo, a Oeste pelos distritos urbanos Nhlamankulu e KaMubukwana (Ex-distritos urbanos nº 2 e 5, respectivamente) e a Leste pela Baía de Maputo (HGM, 2010).

Este hospital é responsável pelos distritos urbanos KaMpfumu, KaMaxakene, KaMavota e pelo distrito urbano número sete distribuídos em 27 bairros. Esta área de saúde possui ainda oito Centros de Saúde e sete Postos de Saúde (HGM, 2010).

As principais causas de internação no setor da pediatria do HGM são: infecções respiratórias agudas (IRAs), infecções por HIV e síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), malária, diarreia, desnutrição, entre as outras; sendo o HIV, a principal causa de mortalidade nestes últimos anos (HGM, 2010). A **Figura 3.1** mostra a planta da área de saúde de Mavalane.



**Figura 3.1.** Mapa da África, Moçambique e perfil da planta da área de Saúde de Mavalane.

(Fonte: [www.cemcrei.blogspot.com](http://www.cemcrei.blogspot.com); <http://agramadavizinha.com/2011/12/22/mocambique-ai-fui-eu/>; [www.misau.gov.mz/](http://www.misau.gov.mz/) Perfil Sanitário Integrado da Área de Saúde de Mavalane; acesso 04/09/2012, adaptado por Bero, 2012).

### **3.3 Considerações éticas**

O estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Bioética em Saúde de Moçambique com a referência: 280/CNBS/11 (**Anexo 1**).

Os responsáveis legais das crianças participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo 2**). Os registos relativos a sua participação foram considerados confidenciais (usados apenas para os efeitos do estudo).

A participação nesta pesquisa não trouxe nenhum risco adicional para os participantes/voluntários selecionados, pois não houve intervenção direta no organismo do paciente participante, nem houve procedimentos invasivos acrescidos fora da rotina clínica a que o doente foi submetido no hospital.

### **3.4 Desenho do estudo**

O estudo é do tipo descritivo transversal. Visando estudar a distribuição epidemiológica dos Enterovírus ao longo do período de coleta. Foram incluídas amostras fecais de crianças que reuniam os critérios de inclusão, e que os responsáveis legais consentiram sua participação no estudo, através do termo de consentimento livre e esclarecido.

A amostragem do estudo foi consecutiva, onde foram selecionados todos os pacientes que preenchiam os critérios de inclusão, até o fim do período do estudo.

### **3.5 Critérios de inclusão**

Foram incluídas neste estudo crianças menores de 15 anos (dos 0 aos 180 meses) internadas na pediatria do HGM, a partir dos dados de seus prontuários médicos. Os que apresentaram quatro ou mais, sinais e ou sintomas compatíveis a infecção por enterovírus, e apenas aquelas cujos os responsáveis legais consentiram na sua participação através do termo de consentimento livre e esclarecido foram convidados a integrar o presente estudo.

Os sinais e sintomas utilizados na seleção dos participantes foram: febre, dor de cabeça, prostração, resfriado comum, tosse, dores musculares, deficiência motora, obstipação, vômitos/náusea, diarreia, conjuntivite, exantema, pequenas vesículas ou pústulas vermelhas (nos pés, mãos e boca), rigidez na nuca, convulsões, dificuldade respiratória e outros sintomas (**Anexo 3**).

Aos responsáveis legais das crianças que consentiram a participação no estudo, foi fornecido um coletor plástico universal de 50 mL para a coleta das fezes das crianças que não usavam fraldas. Para as outras, as fezes foram colhidas diretamente das fraldas com auxílio de uma espátula.

### **3.6 Critérios de exclusão**

Foram excluídas do estudo todas as crianças que não apresentaram quadro clínico compatível com infecção por enterovírus e as que os responsáveis legais não consentiram sua participação.

### **3.7 Análise do perfil dos participantes**

Alguns aspectos dos participantes como idade, sexo, tipo de alimentação, e características clínicas, como sinais e sintomas, motivo de hospitalização, número de pessoas que dormem no mesmo quarto, foram analisados a partir das fichas preenchidas junto aos responsáveis legais pelos participantes (**Anexo 3**).

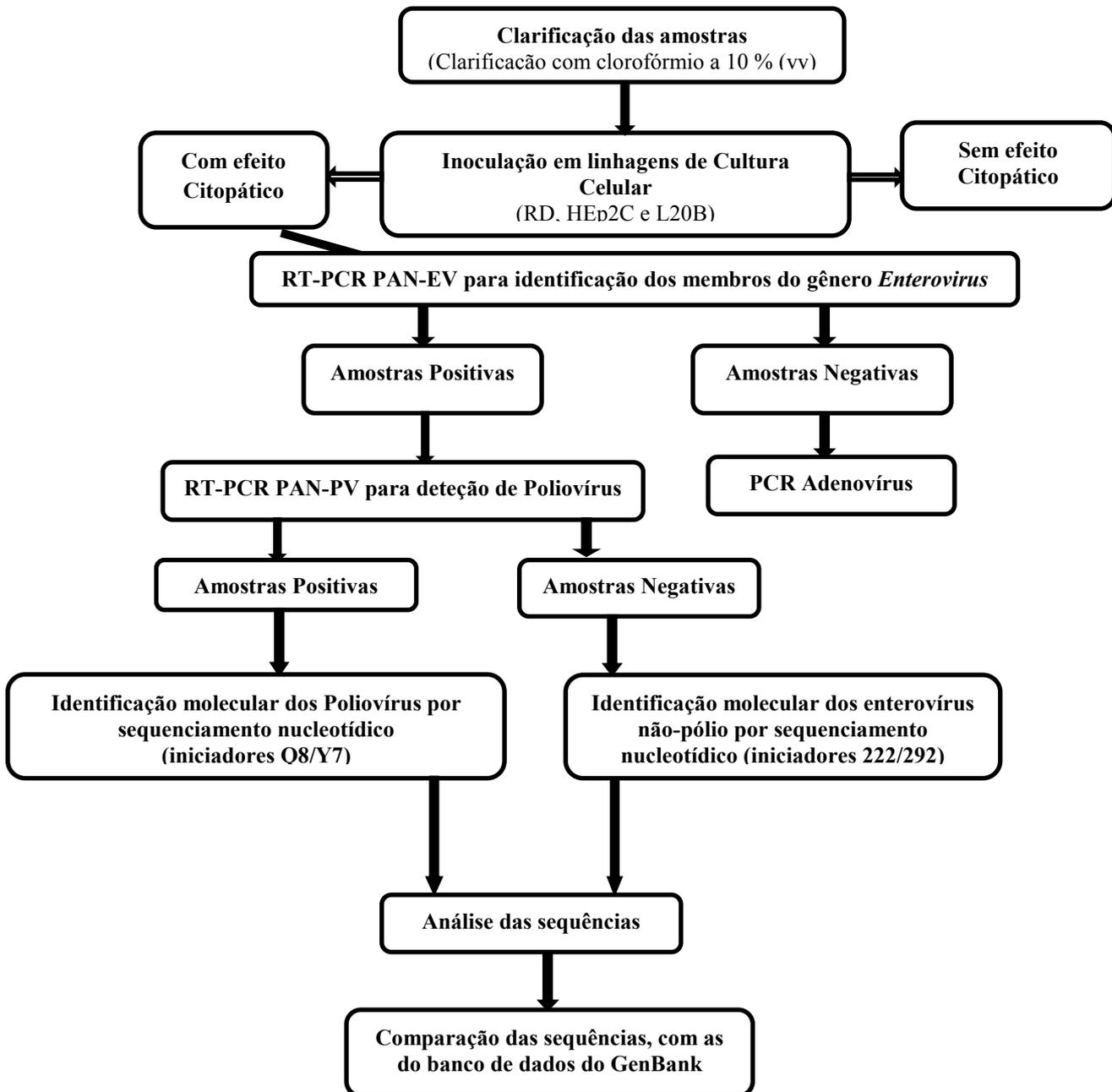
### **3.8 Coleta, transporte e conservação das amostras**

Das crianças que atenderam os critérios de inclusão, foi coletada uma amostra de fezes, em um volume equivalente a 14 gramas. O coletor plástico universal de 50 mL utilizado para a coleta das amostras foi devidamente identificado com o nome do paciente e data da coleta. As amostras foram transportadas em caixa térmicas refrigerada com gelo reciclável até o Laboratório de Isolamento Viral (LIV) do Instituto Nacional de Saúde de Moçambique. As amostras foram armazenadas a temperaturas de  $-70^{\circ}\text{C}$ , durante o período da coleta até o transporte para o Laboratório de Enterovírus (LEV) do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/Brasil.

### 3.9 Processamento laboratorial das amostras

O processamento das amostras no Laboratório de Enterovírus seguiu o fluxograma ilustrado abaixo, na **Figura 3.2**.

**Figura 3.2.** Fluxograma simplificado do processamento laboratorial



### **3.10 Clarificação das amostras fecais**

Em tubo de centrífuga cônico de 15 mL (tipo Falcon), adicionou-se 1 g de pérolas de vidro, 10 mL de meio mínimo essencial (MEM) contendo antibiótico (Penicilina e Estreptomicina, a 1 %), 1 mL de clorofórmio 10 % v/v e por fim adicionaram-se 2 gramas de fezes. O tubo foi homogeneizado por 20 minutos em agitador e, posteriormente, centrifugado por 25 minutos em centrífuga refrigerada a 4500 rpm à 8 °C. Ao final, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, devidamente rotulado. As suspensões fecais foram armazenadas a temperatura de -20 °C, até a posterior inoculação nas culturas celulares. Este método, além da eliminação de bactérias e fungos, remove lipídios potencialmente citotóxicos e dissocia os agregados a vírus.

### **3.11 Isolamento viral em linhagens de cultura celular**

As suspensões fecais foram inoculadas em culturas celulares, de linhagens selecionadas por permitirem a replicação de enterovírus. A pesquisa do vírus através da inoculação destas amostras em culturas de células foi feita como descrito no Manual de Diagnóstico da Rede de Laboratórios de Referência para Poliomielite da Organização Mundial de Saúde - OMS (WHO, 2004). As linhagens celulares utilizadas foram célula de linhagem continua proveniente de rhabdomiosarcoma humano (RD); linhagem celular transgênica derivada de células L de camundongo, que expressa receptores para os poliovírus (L20B), e célula de carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp2C). As células foram fornecidas pelo Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA (CDC) ao LEV/Fiocruz.

Cada suspensão fecal previamente clarificada foi inoculada em um volume de 0,2 mL em tubos contendo 1,8 mL de uma suspensão contendo  $11 \times 10^4$  células/ mL RD;  $12 \times 10^4$  células/ mL L20B; e em tubos contendo  $11 \times 10^4$  células/ mL HEp2C. Os tubos foram incubados a 37 °C na estufa, e leituras diárias foram realizadas com o auxílio de um microscópio invertido, por sete dias consecutivos em todas as linhagens celulares. Em seguida, as amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento rápido, em gelo seco e álcool, seguido por aquecimento a 37 °C, visando à liberação das partículas virais para uma segunda passagem em cultura celular, um novo ciclo de avaliação de efeito citopático foi realizado por mais sete dias consecutivos.

Decorrido o tempo de leitura diária, os tubos com as amostras onde foi observada a existência de efeito citopático característico de enterovírus foram armazenados a temperaturas de -20 °C para posterior confirmação por RT-PCR. O efeito citopático característico foi

identificado pela mudança de metabolismo celular, alterando as suas características morfológicas, onde as células tornam-se arredondadas, enrugadas, e apresentaram picnose nuclear acentuada, degeneração e deslocamento da superfície do suporte.

Para cada grupo de amostras inoculadas, foi utilizado um controle celular, sendo constituído apenas de células e meio mínimo essencial. As etapas de preparação dos tubos com as culturas celulares e as etapas de inoculação das amostras nessas culturas foram procedidas em ambientes físicos separados, para evitar contaminação cruzada.

### **3.12 Detecção de enterovírus entre os isolados em linhagens de cultura celular**

#### **3.12.1 RT-PCR PAN-EV para detecção de membros do gênero *Enterovirus***

##### *Princípio da técnica*

A reação em cadeia da polimerase (PCR) constitui um método de alta sensibilidade para a detecção de ácidos nucleicos virais. No caso de vírus em que o RNA constitui o material genômico, é necessário uma etapa de transcrição reversa. A reação de PCR é baseada na amplificação do molde do cDNA, por ciclos repetidos que compreendem três etapas diferentes. Inicialmente, ocorre uma desnaturação da fita dupla, a fim de se obter uma fita simples de DNA, posteriormente, ocorre a ligação dos oligonucleotídeos às fitas opostas do DNA molde a uma segunda temperatura para o anelamento, e finalmente, a terceira etapa consiste na extensão da nova cadeia de DNA, sintetizada a partir do oligonucleotídeo ligado ao DNA molde, ao repetir estas etapas cerca de 30 a 40 vezes, é obtida por uma amplificação teoricamente exponencial da região do DNA coberto pelos oligonucleotídeos. Este produto da primeira reação da PCR é utilizado para a segunda amplificação.

Para detetar Enterovírus, entre os isolados, foi utilizada a técnica de transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O par de iniciadores denominados EVR e EVF (reverso e senso, respectivamente, **Anexo 4**) foram utilizados nas reações de RT-PCR da região terminal 5'NC do RNA, para a identificação de membros do gênero *Enterovirus*. Para esta região o tamanho do fragmento amplificado é de 153 pb (WHO, 2004). Este par de iniciadores é utilizado na rotina de diagnóstico do Laboratório de Enterovírus.

Para a amplificação desta região, 1  $\mu\text{L}$  da suspensão celular contendo o vírus foi aplicado em tubos de 0,2 mL. A seguir foi aquecido à 95 °C por 3 minutos para inativação viral. Fez-se uma centrifugação rápida por 30 segundos a 13400 rpm, depois colocou-se em banho de gelo por 5 minutos em banho de gelo para o choque térmico. Após a inativação, foram acrescentados 3,2  $\mu\text{L}$  da Mistura A (composta por: 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10X para PCR e 0,7  $\mu\text{L}$  do iniciador R a 5 pmoles/  $\mu\text{L}$ ), e foi procedida uma etapa de desnaturação do RNA seguida de uma etapa de hibridização do iniciador R, submetendo a mistura primeiro a 95 °C por 5 minutos e depois colocou-se em banho de gelo.

Em seguida, foram adicionados ao tubo 20,8  $\mu\text{L}$  da Mistura B (composta por: 0,7  $\mu\text{L}$  do iniciador F a 5 pmoles/  $\mu\text{L}$ ; 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP's 10 mM (Invitrogen); 0,15  $\mu\text{L}$  de *RNASin* a 5U/  $\mu\text{L}$  (*Recombinant Ribonuclease inhibitor*, Invitrogen); 0,2  $\mu\text{L}$  de *Taq DNA polymerase* a 5U/  $\mu\text{L}$  (Fermentas); 0,2  $\mu\text{L}$  da Transcriptase reversa a 20U/  $\mu\text{L}$  (*SuperScript II reverse Transcriptase*, Invitrogen), e 19,05  $\mu\text{L}$  de água deionizada autoclavada para um volume final de reação de 25  $\mu\text{L}$ .

A reação de RT-PCR foi realizada com uma etapa de transcrição reversa de 42 °C por 30 minutos, seguida por 30 ciclos de 45 segundos a 95 °C para a desnaturação, 45 segundos a 55 °C para o anelamento do iniciador e 45 segundos a 72 °C para a extensão, em termociclador *Veriti™ 96-well Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

As reações de RT-PCR foram acompanhadas por um controle positivo e um controle negativo. Para isso, foram utilizados os mesmos reagentes e enzimas para as amostras e para os controles. Amostras conhecidas (pertencente ao gênero *Enterovirus*) foram usadas como controles positivos das reações (o volume utilizado foi igual ao da amostra: 1  $\mu\text{L}$ ) e água estéril foi usada como controle negativo das reações. Os controles serviam para verificar: a eficiência da reação, dos reagentes e também para verificar se houve contaminação durante a manipulação das amostras ou dos reagentes.

A manipulação das amostras e o preparo das misturas de enzimas e reagentes utilizados na RT-PCR foram feitos em ambientes distintos, a fim de evitar contaminação.

### **3.12.2 Avaliação dos produtos de RT-PCR da Região 5'NC por eletroforese em gel de acrilamida**

Para a visualização dos produtos amplificados na RT-PCR, 11 µL de amostra foram acrescidos a 2,0 µL de tampão de corrida 6X. A mistura foi aplicada nos poços de um gel de acrilamida a 10 %. Foi utilizado como referência peso molecular de escada de 50 pb (Fermentas).

A corrida eletroforética foi realizada a 100 V em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X por 90 minutos e, em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (a concentração de 1,0 µg/mL). Os produtos da amplificação foram visualizados em um transiluminador (luz UV, modelo UNIVERSAL Hood II- BIORAD).

### **3.13 RT-PCR PAN-PV para identificação de poliovírus**

Para detectar poliovírus dentre os enterovírus positivos na RT-PCR PAN-EV, foi utilizada a técnica de RT-PCR, usando um iniciadores específico para os poliovírus denominado PVR e PVF, relativo a região VP1 da proteína. Para esta reação o tamanho do fragmento amplificado é de 79 pb (WHO, 2004). Este par de iniciadores é utilizado na rotina de diagnóstico do Laboratório de Enterovírus. A sequência dos iniciadores e a posição do genoma estão descritos no **Anexo 4**.

Para a construção do cDNA e posterior amplificação, a metodologia usada é a mesma realizada para o PCR PAN-EV, exceto o ciclo de amplificação. Assim a reação de RT-PCR foi realizada com uma etapa de transcrição reversa de 42 °C por 30 minutos, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 1 minuto a 72 °C, em termociclador *Veriti™ 96-well Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

As reações de RT-PCR foram acompanhadas por um controle positivo e um controle negativo para verificar se houve contaminação durante a manipulação das amostras ou dos reagentes. A avaliação dos produtos de PCR foi realizada conforme descrito no item **3.12.2**.

### **3.14 Identificação molecular dos enterovírus isolados**

#### **3.14.1 Extração de RNA viral**

As amostras virais positivas para o gênero *Enterovirus*, com o uso dos iniciadores grupo-específicos na RT-PCR PAN-EV (item **3.12.1**), foram submetidas à extração de RNA utilizando o kit QIAamp viral RNA Mini (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

### *Princípio da técnica*

Suspensões de cultura de células são inicialmente submetidas a uma etapa de lise enzimática. Através da precipitação por isopropanol, o lisado é transferido para colunas seguido por centrifugação, o material genômico fica adsorvido a membrana de sílica presente na coluna. O pH e salinidade do lisado não permitem que as proteínas ou outros contaminantes ocasionalmente presentes fiquem aderidos à membrana. Etapas de lavagem são posteriormente conduzidas e seguidas da eluição do ácido nucléico.

### **3.14.2 Síntese do DNA complementar (c-DNA)**

#### *Princípio da técnica*

A transcrição reversa consiste na síntese *in vitro* de uma fita de DNA complementar à cadeia molde do RNA. Para o efeito sendo, necessário que um oligonucleotídeo se ligue à região 3' NC da cadeia do RNA e, posteriormente, a enzima transcriptase reversa sintetiza a cadeia de DNA complementar, a partir da incorporação de nucleotídeos.

#### *Procedimento*

A síntese da fita de c-DNA, foi feita em três fases: na primeira, foi adicionado 9 µL do RNA extraído: 1,0 µL do iniciador *Random* (Promega) a 100 pmoles/ µL para enterovírus não-pólio ou 1,0 µL de iniciador *Oligo-dT* (Promega) a 100 pmoles/ µL para amostras positivas para poliovírus. O tubo foi homogeneizado e a mistura foi incubada a 65 °C por 10 minutos. Em seguida, na segunda fase: foram adicionados 4,0 µL de tampão 5X “first strand c-DNA” (Invitrogen); 2,0 µL de Di-Thio-Treitol à 0,1M (*DTT*, Invitrogen); 1,5 µL de dNTP's à 10 mM/ µL (Invitrogen); 0,5 µL de “RNAse out” a 40U/ µL (Promega) e 1,0 µL de água deionizada autoclavada. O tubo foi homogeneizado e a mistura foi incubada a 42 °C por 2 minutos. Finalmente, foi acrescido 1,0 µL da Transcriptase reversa a 20U/ µL (*SuperScript II reverse Transcriptase*, Invitrogen) e esta mistura foi submetida a uma incubação de 42 °C por 50 minutos. Ao final, o c-DNA foi armazenado a -20 °C. Todas as incubações da síntese de c-DNA foram feitas em termociclador *Veriti™ 96-well Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

### **3.14.3 Reação em Cadeia da Polimerase para enterovírus não-pólio**

Para esta reação, nas amostras enterovírus não-pólio, adicionou-se em tudo de 0,2 mL: 3 µL de c-DNA a uma mistura, composta de 25 µL enzima Go Taq® Green Master Mix (Taq DNA polimerase 1,25 U; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; *Promega*); 1,0 µL do iniciador 222 à 50 pmoles/ µL e 1,0 µL do iniciador 292 à 50 pmoles/ µL (**Anexo 4**), e 20 µL de água deionizada autoclavada para completar um volume final de reação de 50 µL. O par de iniciadores utilizado amplifica o gene da proteína VP1 dos enterovírus, amplificando um fragmento de 357 pb. Essa mistura foi submetida a 35 ciclos, sendo 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 42 °C e 30 segundos a 60 °C, e a uma extensão final de 7 minutos a 72 °C em termociclador *Veriti™ 96-well Thermal Cycler* “Applied Biosystems” (Oberste et al. 2000). Este par de iniciadores é utilizado na rotina de diagnóstico do Laboratório de Enterovírus.

### **3.14.5 Avaliação do produto da PCR em gel de agarose**

Para visualização dos produtos da PCR, as amostras no volume de 50 µL, foram aplicadas em gel de agarose a 1 %, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, contendo solução de brometo de etídio (a concentração de 1,0 µg/ mL), utilizando como marcador de peso molecular de escada de 100 bp (Invitrogen) como referência. A corrida da eletroforética foi realizada a 110 V em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X por 60 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em um transiluminador (luz UV) e as bandas foram cortadas e retiradas do gel de agarose para eluição do DNA.

### **3.14.6 Purificação do DNA**

Os produtos da PCR correspondentes (ao fragmento de 357 pb para enterovírus não-pólio e 1100 pb enterovírus pólio), foram extraídos do gel de agarose, purificados com o uso do Kit “*QIAquick® Gel Extraction*” (Qiagen), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. O método baseia-se na capacidade de ligação do DNA a sílica na coluna, quando a amostra passa por ela durante o processo de centrifugação.

Após as bandas terem sido excisadas e colocadas em tubo tipo eppendorf de 1,5 mL, foram adicionados 500 µL do tampão de solubilização (QG) das amostras. A seguir os DNAs foram incubados por 10 minutos a 50 °C, com homogeneizações a cada 3 minutos durante a incubação. Após o gel ser dissolvido, foi adicionado 200 µL de Isopropanol.

Em seguida, transferiu-se as amostras para coluna previamente conectada a um tubo colector de 2 mL fornecido pelo Kit. A coluna foi centrifugada por 1 minuto a 13200 rpm. Ao fim da centrifugação, o filtrado foi descartado, e mais 200 µL do tampão solubilização foram adicionados para remover os resíduos de agarose e a coluna novamente centrifugada por 1 minuto a 13200 rpm. O filtrado mais uma vez foi descartado.

Para a lavagem da coluna contendo o DNA, adicionou-se 500 µL do tampão de lavagem. A coluna foi centrifugada por 1 minuto a 13200 rpm. O filtrado foi descartado e os tubos foram novamente centrifugados por 1 minuto a 13200 rpm, para retirar todo o resíduo de etanol.

Cada coluna foi separada do tubo coletor e colocada num tubo de 1,5 mL estéril devidamente identificado. O DNA foi eluído adicionando-se 50 µL de tampão de eluição fornecido pelo kit, após incubação por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugação por 1 minuto a 13200 rpm. Finalmente, O DNA eluído foi concentrado 1,6X (*Concentrator 5301* – Eppendorf) e foi armazenado à -20 °C, até ao momento do uso na quantificação do DNA.

#### **3.14.6 Quantificação da concentração de DNA**

Os DNA eluídos do gel de agarose foram, quantificados meio da comparação, com um marcador de peso molecular de massa (*Low DNA Mass Ladder* - Invitrogen) conhecido, através de corrida eletroforética em um gel de agarose 1 %, corado em solução de brometo de etídio (a concentração de 1,0 µg/ mL).

Para a quantificação, 4 µL do DNA foi adicionado a 2 µL de tampão de corrida 6X e 6 µL de água deionizada autoclavada. A corrida eletroforética foi realizada a 90 Volts em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X por 30 minutos. Após este período, puderam ser visualizados as bandas sob a incidência da luz ultravioleta a qual ao incidir sobre o brometo de etídio, produz fluorescência. Em seguida comparou-se a intensidade de fluorescência dos DNAs precipitados com as bandas equivalentes do padrão de massa conhecido, por volume igual adicionados no gel.

#### **3.14.7 Reações de sequenciamento**

As concentrações de DNA utilizadas para as reações de sequenciamento foram padronizadas em função da concentração do DNA. Concentrações de 100 ng/ µL de DNA foram suficientes para produzir eletroferogramas que forneceram leituras confiáveis das

sequências. Foi utilizado o kit “ABI BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1”, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (PE Applied-Biosystems). O método de sequenciamento do kit “BigDye” é baseado na incorporação dos dideoxinucleotídeos (ddNTP's) durante a reação de sequenciamento propriamente dita.

#### **3.14.8. Reações de sequenciamento para enterovírus não-pólio**

Para as reações de amostras consideradas positivas enterovírus não-pólio, o iniciador denominado 222 (**Anexo 4**) foi utilizado sendo: 1,0 µL do iniciador 222 a 5 pmoles/ µL (reverso – R, em cada um dos tubos); 1,5 µL do tampão de sequenciamento fornecido pelo kit; 3,0 µL do *Big Dye<sup>®</sup> Terminator*, o DNA e água deionizada autoclavada, se necessário, para completar o volume final de 15 µL.

Estas reações foram realizadas em termociclador *Veriti<sup>™</sup> 96-well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), com 25 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 42 °C e 3 minutos a 60 °C para as amostras onde usou-se o iniciador 222.

#### **3.14.9. Reações de sequenciamento para enterovírus pólio**

Para as amostras consideradas positivas para poliovírus o iniciador Q8 e Y7 (**Anexo 4**), foi utilizado: 1,0 µL de cada iniciador a 5 pmoles/ µL (reverso e senso), um em cada tubo: 1,5 µL do tampão de sequenciamento fornecido pelo kit; 3,0 µL do *Big Dye<sup>®</sup> Terminator*, o DNA e água deionizada autoclavada, se necessário, para completar o volume final de 15 µL.

Estas reações foram realizadas em termociclador *Veriti<sup>™</sup> 96-well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), que consistiu em 60 segundos a 94 °C, seguido de 32 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 55 °C e 2 minutos a 72 °C e por fim 7 minutos a 72 °C, para as amostras onde usaram-se os iniciadores Q8 e Y7.

#### **3.14.10 Purificação dos produtos das reações do sequenciamento**

Os produtos das reações do sequenciamento foram purificados por precipitação com álcool isopropílico. O produto da reação (15 µL) foi transferido para um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL. Adicionou-se 80 µL de álcool isopropílico à 75 %. O DNA foi brevemente agitado e deixado em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente, para precipitação.

Em seguida, foi centrifugado por 20 minutos a 14000 rpm à 8 °C. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 250 µL de álcool isopropílico à 75 %. A mistura foi rapidamente agitada e centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm à 8 °C. O sobrenadante foi desprezado e o DNA precipitado foi completamente seco a vácuo (*Concentrator 5301* - Eppendorf). Por fim o DNA foi armazenado, protegido da luz a -20 °C, até ao momento do uso.

O preparo das misturas de enzimas e reagentes utilizados no ciclo de sequenciamento, a manipulação e a purificação destes produtos foram feitos em ambientes distintos, de modo a evitar contaminação.

#### **3.14.11 Sequenciamento e análise das sequências**

As amostras purificadas foram ressuspensas em 20 µL de Hi-Di formamida, agitadas por 5 minutos e aquecidas a 95 °C por 3 minutos para desnaturação, e evitar a formação de estruturas secundárias. As amostras foram então entregues a Plataforma de sequenciamento de DNA/ PDTiS/ Fiocruz.

Os produtos das reações de sequenciamento foram lidos no sequenciador automático *3730XL DNA Analyser Hitachi* (Applied Biosystems). Após a obtenção das sequências nucleotídicas, elas foram analisadas utilizando o programa Bio-Edit 7.0 (Hall, 1999). Quando necessário as sequências foram editadas e comparadas com as sequências previamente depositadas no banco de dados do GenBank pelo uso do programa BLASTN 2.2.27, para identificação vírus isolado e respectivo sorotipo viral (Altschul et al. 1990).

Após a identificação dos sorotipos virais, procedeu-se a construção da árvore filogenética a fim de se fazer o relacionamento filogenético e molecular com outros vírus da mesma espécie pelo uso do programa MEGA versão 4.0.2 (Tamura et al. 2007).

#### **3.15 Pesquisa de adenovírus humanos**

As amostras que foram isoladas em cultura de células e negativas o RT - PCR PAN-EV (Item 3.12.1), foram submetidas a outra reação de PCR, para pesquisar a presença de Adenovírus humanos, por terem apresentado efeito citopático sugestivo de adenovírus.

Assim, 1 µL de suspensão celular contendo vírus foi adicionado em tubos de 0,2 mL. A seguir as amostras foram incubadas a 95 °C por 3 minutos para a inativação viral.

As próximas etapas foram, centrifugação rápida por 30 segundos a 13400 rpm, e incubação em banho de gelo por 5 minutos para um choque térmico. Após a inativação, foram acrescentados 24 µL da Mistura (composta por: 0,7 µL do iniciador AD (1) a 50 pmoles/ µL; 0,7 µL do iniciador AD (4) a 50 pmoles/µL (**Anexo 4**); 2,5 µL de tampão 10X para PCR; 0,5 µL de dNTP's 10 mM/ µL (Invitrogen); 0,25 µL de *Taq DNA polymerase* a 5U/ µL (*Platinum Taq DNA polymerase*, Invitrogen) e 19,35 µL de água deionizada autoclavada para completar o volume final da reação de 25 µL. Os iniciadores utilizados nesta reação, foram previamente descritos Xu et al, (2000).

Estas reações foram realizadas em termociclador *Veriti™ 96-well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), com uma desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos e seguida de 30 ciclos repetitivos de, 45 segundos a 94 °C, 20 segundos a 54 °C e 1 minutos a 72 °C. Uma amostra conhecida de adenovírus foi usada como controle positivo da reação e água estéril como controle.

A avaliação dos produtos amplificados foi realizada em gel de acrilamida e o DNA visualizado em transiluminador ultravioleta conforme já descrito no item **3.12.1**. O tamanho do fragmento esperado era de 134 pb.

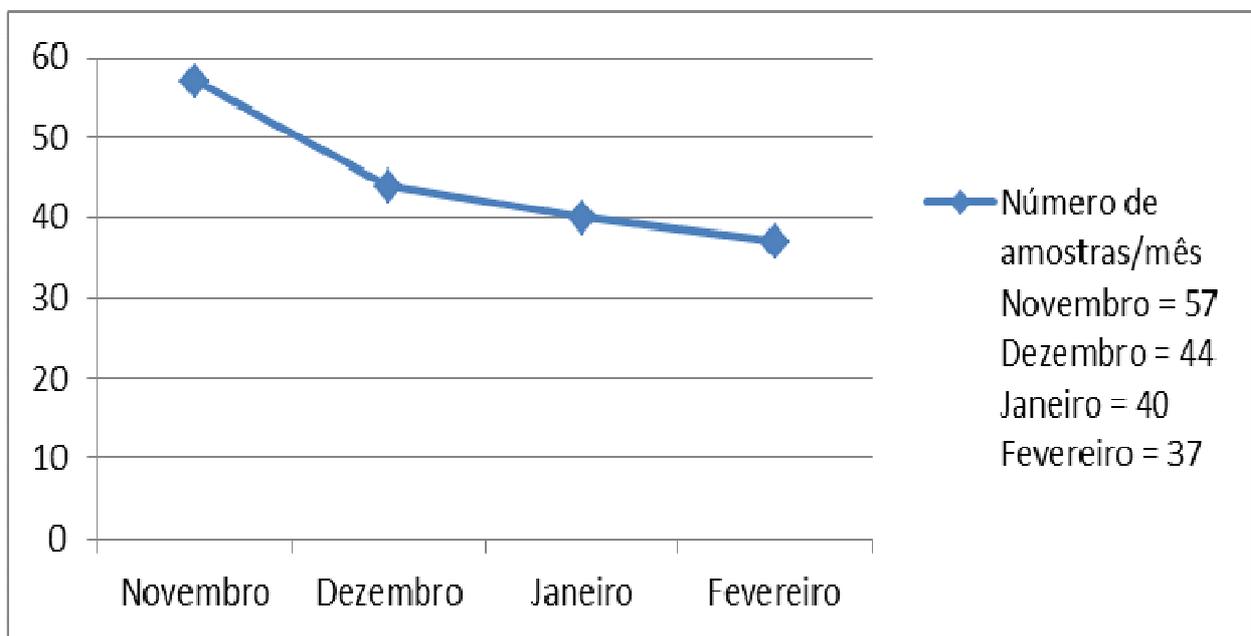
### **3.16 Métodos estatísticos**

Os dados relativos a características sociodemográficas foram armazenados numa planilha Epi info versão 3.5.1. A comparação das frequências foi realizada pelo teste **z** (**p** corrigido de Yates). Foi considerando 0.05 como nível de significância estatística, através do programa Epi info versão 3.5.1. Quando a frequência foi menor de cinco foi usado o teste exato de Fisher em lugar de **z** (CDC, 2011).

## RESULTADOS

### 4.1 Amostras clínicas

As amostras clínicas, utilizadas neste estudo foram coletadas durante o período entre novembro de 2011 à fevereiro de 2012, no HGM na cidade de Maputo, em Moçambique. Durante o período a cima citado coletou-se 178 amostras fecais provenientes de participantes internados na pediatria do hospital supracitado, apresentando diversos quadros clínicos sugestivo da infecção por Enterovírus humanos. O número de amostras durante o período de estudo, oscilou entre 37 e 57 amostras por mês (**Figura 4.1**).



**Figura 4.1. Distribuição temporal da coleta das amostras (novembro de 2011 – fevereiro de 2012).** O número das amostras coletadas durante o período de estudo, sendo: 57 em novembro, 44 em dezembro, 40 em janeiro e 37 em fevereiro.

### 4.2. Características sociodemográficas e clínicas dos participantes

Todos os 178 participantes tiveram a idade informada, que variou de 1 mês a 155 meses. A maioria destes pacientes (139/178 – 78,1 %) tinha entre 1 mês a 60 meses de idade, tendo como mediana 17,5 meses (IIQ = 9 a 53 meses) e com média de 33 meses (DP = 33,6). Entre os participantes do estudo, havia 92 (51,7 %) pacientes do sexo masculino e 86 (48,3 %) do sexo feminino. Os sinais e sintomas mais reportados foram: febre (98,9 %); vômitos/náusea (65,2 %); tosse (59,0 %); diarreia (52,2 %); e dificuldade respiratória

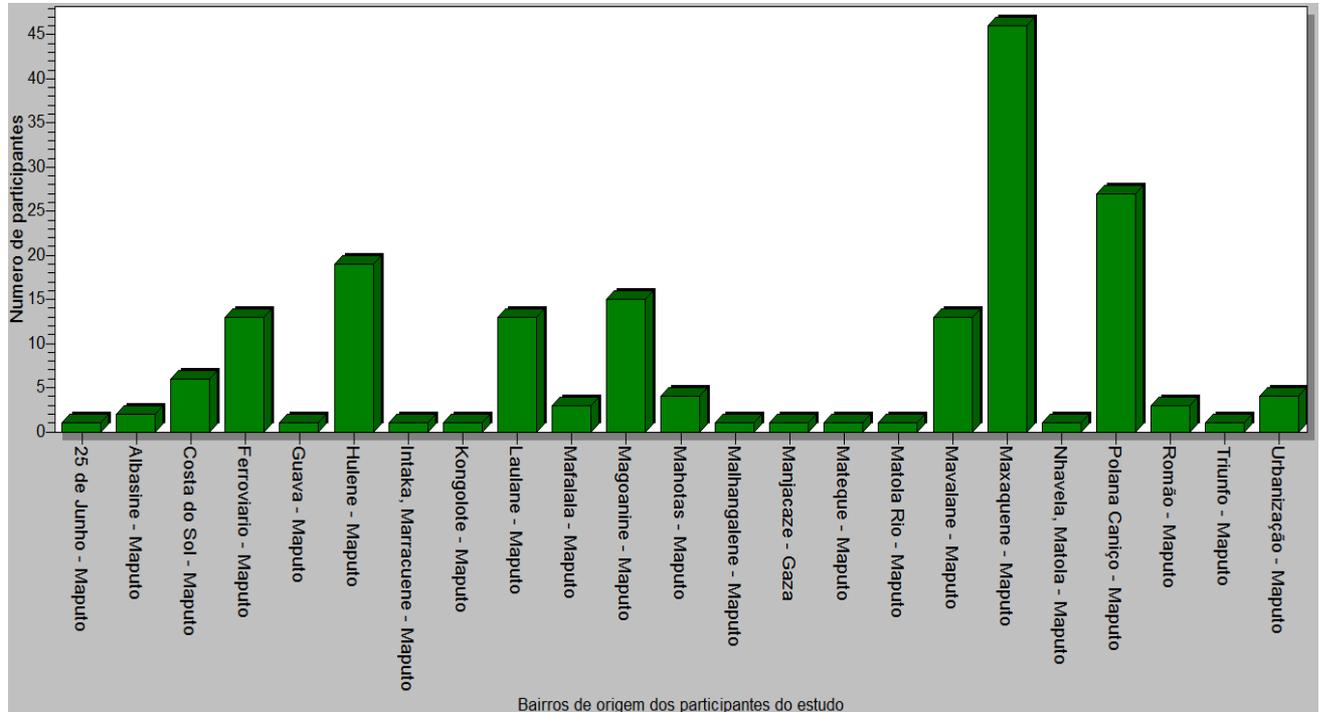
(35,4 %). A **Tabela 4.1** demonstra as características demográficas, sociais e clínicas dos participantes do estudo. Apenas três pacientes não tinham sido vacinados contra a poliomielite; enquanto que 130 já tinham recebido três doses da vacina contra a poliomielite. Os principais motivos que levaram a internação dos pacientes foram: malária (34,2 %); desnutrição (23,6 %); gastroenterite aguda (17,4 %); bronquiopneumonia (16,9 %).

**Tabela 4.1. Características sociodemográficas e clínicas dos participantes do estudo.**

<b>Número de participantes:</b>	<b>n= 178</b>
<b><i>Sexo (%):</i></b>	
Feminino	86 (48,3 %)
Masculino	92 (51,7 %)
<b><i>Idades em meses por faixas etárias (%):</i></b>	
0 – 24 meses	107 (60,1 %)
25 – 60 meses	32 (18,0 %)
61 – 120 meses	32 (18,0 %)
121 – 180 meses	7 (3,9 %)
<b><i>Tipo de alimentação (%):</i></b>	
Somente leite materno	14 (7,9 %)
Mista (Leite materno e outros)	36 (20,2 %)
Diversificada (Outros)	128 (71,9 %)
<b><i>Principais sinais e sintomas reportados:</i></b>	
Febre	176 (98,9 %)
Vômitos/Nausea	116 (65,2 %)
Tosse	105 (59,0 %)
Diarréia	93 (52,2 %)
Dificuldade de respirar	63 (35,4 %)
Prostação	45 (25,3 %)
Dor de cabeça	40 (22,5 %)
Dores musculares	40 (22,5 %)
Resfriado comum	11 (6,2 %)
Pequena visículas	5(2,8 %)
Rigidez de nuca	3 (1,7 %)
Obstipação	3 (1,7 %)
Deficiência motora	2 (1,1 %)
Outros sintomas	77 (43,3 %)
<b><i>Condições associadas (%):</i></b>	
SIDA/HIV	28 (15,7 %)
Outras condições	54 (30,4 %)
Sem condições associadas	96 (53,9 %)
<b><i>Principais motivos de internação (%):</i></b>	
Malária	61 (34,2 %)
Desnutrição	42 (23,6 %)
GEA	31 (17,4 %)
BPN	30 (16,9 %)
Outros motivos	14 (7,9 %)

BPN = Bronquiopneumonia; GEA = Gastroenterite aguda

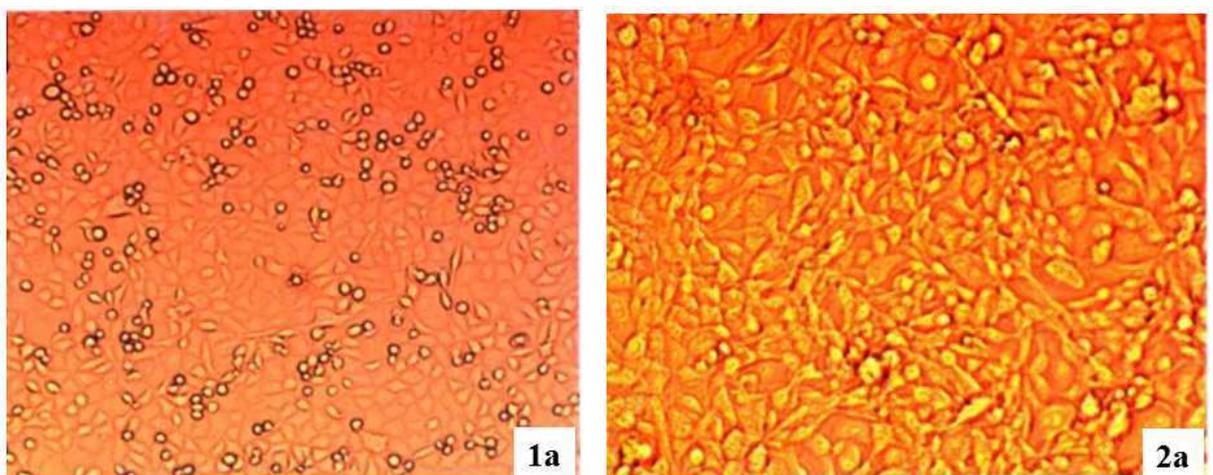
A distribuição geográfica dos participantes do estudo esta apresentado na **Figura 4.2**. O maior número dos pacientes era proveniente dos bairros de: Maxaquene 25,8 % (46), Polana Caniço 15,2 % (27), Hulene 10,7 % (19) e Magoanine 8,4 % (15).

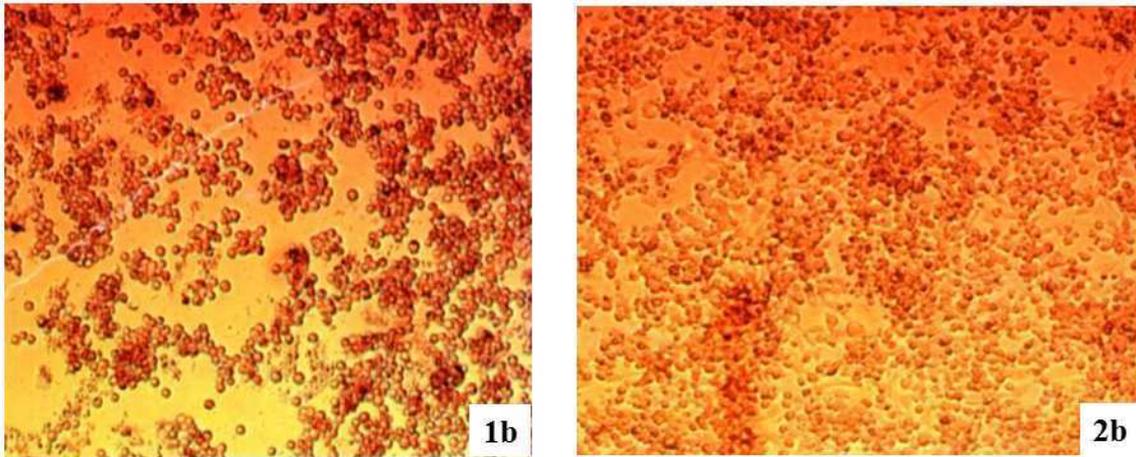


**Figura 4.2. Distribuição geográfica dos participantes do estudo em relação aos bairros de origem.**

### 4.3. Isolamento viral em cultura celular

Do universo das 178 amostras de fezes, 45 (25,3 %) tiveram isolamento viral em cultura de células nas linhagens celulares: RD, L20B e HEp2C, apresentando efeito citopático característico (**Figura 4.3**).

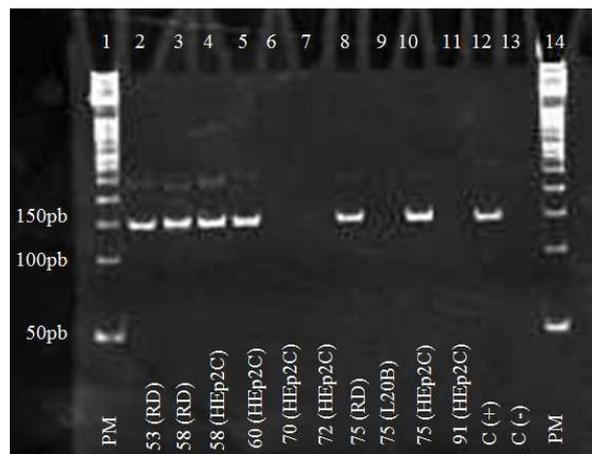




**Figura 4.3.** Linhagens celulares, L20B (1a) e RD (2a) antes da inoculação da amostra; L20B (1b) e RD (2b), após inoculação e apresentação de efeito citopático. Fonte: WHO, (2004).

#### 4.4. Identificação de Enterovírus entre os isolados por RT-PCR PAN-EV

A reação de RT-PCR Grupo foi realizada para confirmar o resultado do isolamento viral, e caracterizar os vírus isolados como pertencentes ao gênero *Enterovirus*. Entre as 45 amostras que apresentaram efeito citopático nas linhagens celulares, 26 foram positivas por RT-PCR Grupo. A **Figura 4.4** ilustra a detecção de membros do gênero *Enterovirus*. Fragmento amplificado de 153 pb, indica o padrão da reação positiva.



**Figura 4.4.** Perfil eletroforético dos produtos amplificados por RT-PCR em gel de acrilamida, para a identificação do gênero *Enterovirus*, utilizando o par de iniciadores EVR-EVF (153 pb). Poço: 1 e 14 – Marcador de peso molecular de escada de 50 pb. Poço: 2, 3, 4, 5, 8 e 10 – Amostras Positivas. Poço: 6, 7, 9 e 11– Amostras Negativas. Poço: 12 e 13 – Controles positivo (12) e Negativo (13) respectivamente.

A **Tabela 4.2** mostra a frequência do isolamento dos enterovírus nas culturas celulares (nas linhagens: RD, L20B e HEp2C) e detecção do RNA viral dos membros do gênero *Enterovirus* por RT-PCR, para o par de iniciadores utilizado, no universo das 178 amostras, 45 foram isoladas na cultura celular e 26 (14,6%) destas foram positivas para enterovírus humanos.

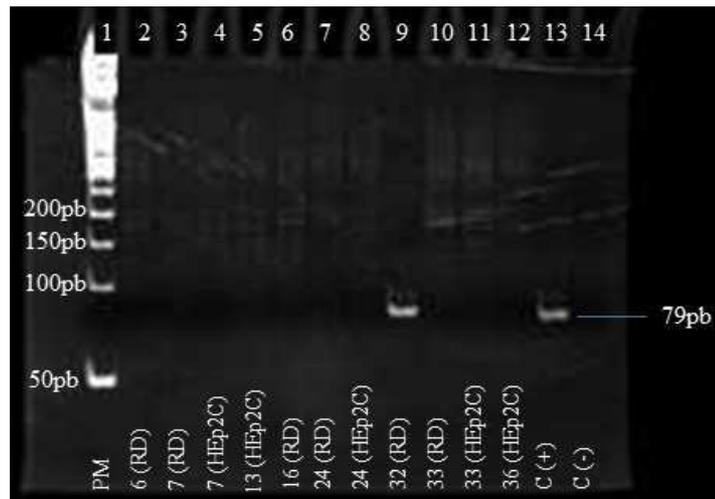
**Tabela 4.2. Amostras que apresentaram efeito citopático e foram positivas na RT-PCR PAN-EV para membros do gênero *Enterovirus*.**

Nº	Linhagens celulares			Resultado da RTPCR PAN-EV			Nº	Linhagens celulares			Resultado da RT-PCR PAN-EV		
	RD	L20B	HEp2C	RD	L20B	HEp2C		RD	L20B	HEp2C	RD	L20B	HEp2C
06	Pos	Neg	Neg	Pos	--	--	103	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg
07	Pos	Neg	Pos*	Pos	--	Neg	105	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg
09	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg	118	Pos	Neg	Neg	Pos	--	--
13	Neg	Neg	Pos	--	--	Pos	119	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg
16	Pos	Neg	Neg	Pos	--	--	121	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg
24	Pos	Neg	Pos	Pos	--	Pos	125	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg
32	Pos	Neg	Neg	Pos	--	--	128	Pos	--	Pos*	Pos	--	Neg
33	Pos	Neg	Pos	Pos	--	Pos	129	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg
36	Neg	Neg	Pos	--	--	Pos	131	Pos	Neg	Neg	Pos	--	--
40	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg	138	Neg	Neg	Pos	--	--	Pos
42	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg	140	Neg	Neg	Pos	--	--	Pos
49	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg	142	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg
53	Pos	Neg	Neg	Pos	--	--	146	Pos	Neg	Neg	Pos	--	--
58	Pos	Neg	Pos	Pos	--	Pos	149	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg
60	Neg	Neg	Pos	--	--	Pos	156	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg
70	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg	159	Pos	Neg	Neg	Pos	--	--
72	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg	161	Pos	Neg	Neg	Pos	--	--
75	Pos	Pos*	Pos	Pos	Neg	Pos	163	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
91	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg	170	Pos	Neg	Pos	Pos	--	Pos
93	Pos	Neg	Neg	Pos	--	--	171	Neg	Neg	Pos	--	--	Pos
96	Pos	Neg	Neg	Pos	--	--	174	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg
100	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg	175	Neg	Pos*	Pos	--	Neg	Pos
101	Neg	Neg	Pos*	--	--	Neg							

Nº = Número da amostra; RD = Célula de Origem Humana Rbdomiossarcoma; L20B = Células L de camundongo expressando o receptor para os poliovírus; HEp2C = Célula de carcinoma epidermóide; Neg = Negativo; Pos = Positivo; **Pos** = Positivo para enterovírus = Não realizado; RT-PCR PAN-EV = Reação para identificação dos membros do gênero *Enterovirus*; \* = amostras negativas ao RT-PCR PAN-EV.

#### 4.5 Identificação de poliovírus entre os enterovírus humanos positivos em RT-PCR

As 26 amostras positivas ao gênero *Enterovirus* (Tabela 4.2), uma reação de RT-PCR, utilizando iniciadores específicos (PVR e PVF, Anexos 4) para detetar poliovírus. O Fragmento de 79 pb foi observado em duas amostras (32 e 163), equivalente a 7,7 % das 26 analisadas. O perfil eletroforético deste produto amplificado, esta exemplificado na Figura 4.5 abaixo ilustrada.

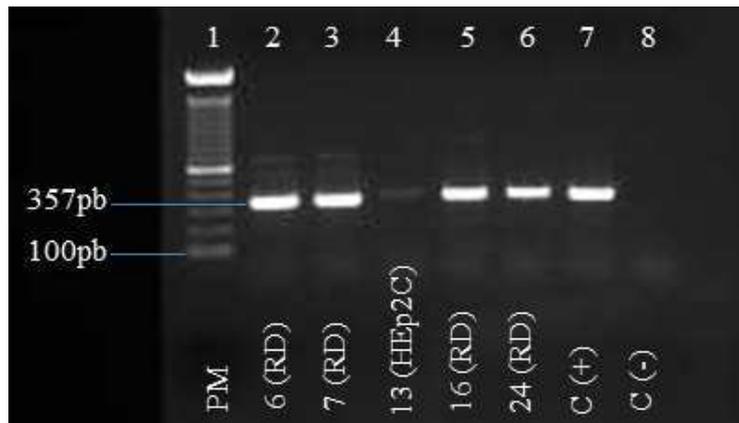


**Figura 4.5.** Perfil eletroforético dos produtos amplificados por RT-PCR em gel de acrilamida, para a identificação de poliovírus entre os membros do gênero *Enterovirus*, utilizando o par de iniciadores PVR-PVF (79 pb). Poço: 1 – Marcador de peso Molecular 50 pb. 9 – Amostra Positiva. 2 a 8, 10, 11 e 12 – Amostras Negativas. 13 e 14 – Controles positivo (13) e Negativo (14).

Uma segunda reação de RT-PCR, após a extração do RNA viral e construção do c-DNA utilizando agora os iniciadores Q8/Y7 (Anexos 4) foi realizada para a amplificação de um fragmento de 1100 pb, com o objetivo de identificar os sorotipos dos poliovírus.

#### 4.6. Identificação dos Enterovírus humanos não-pólio

Para a identificação dos enterovírus não pólio isolados nas amostras, outra reação de RT-PCR, após a extração do RNA viral, foi realizada nas 24 amostras, utilizando o par de iniciadores denominados 222/292 (Anexos 4). A Figura 4.6 ilustra o perfil electroforético do produto amplificado, fragmento de 357 pb, que esta correlacionado com a região do gene amplificada foi observada.



**Figura 4.6.** Perfil eletroforético dos produtos amplificados, por RT-PCR em gel de agarose, para a identificação dos enterovírus não-pólio, utilizando o par de iniciador 222-292 (357 pb). Poço: 1 – Marcador de peso molecular 50 bp; 2 a 6 – Amostras positivas; 7 e 8 – Controle positivo e negativo respectivamente.

#### 4.7 Análise das sequências obtidas dos enterovírus humanos

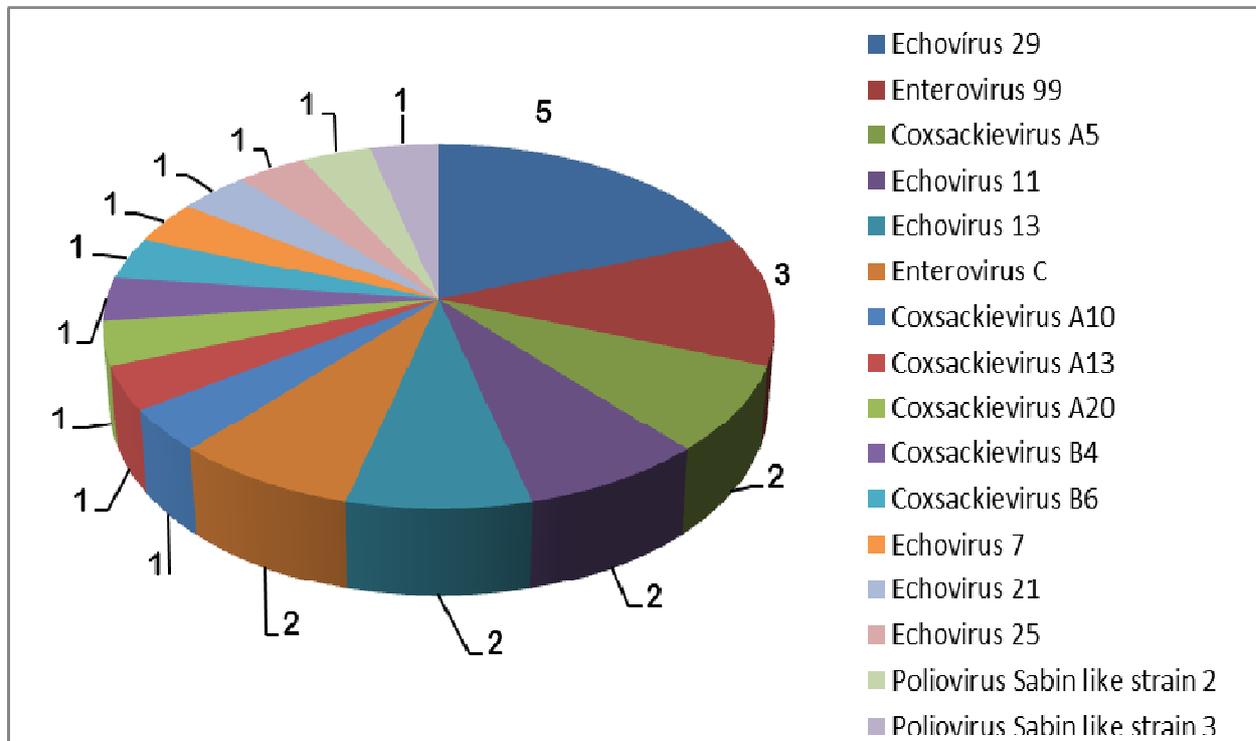
A frequência dos enterovírus humanos neste estudo foi de 14,6 % (26/178). A **Figura 4. 7** ilustra a diversidade dos sorotipos dos vírus identificados. A espécie mais frequente foi Enterovírus humano B (HEV-B) com 14 (53,9 %), seguido da espécie Enterovírus humano C (HEV-C) com 9 (34,6 %) e por fim a espécie Enterovírus humano A (HEV-A) com 3 (11,5 %). Nenhuma amostra foi identificada como a espécie HEV-D.

A espécie HEV-B compreendeu os seguintes sorotipos virais: echovírus 29 (E-29) foi identificado em cinco das 26 amostras (19,2 %); E-11 e E-13 foi identificado em 2/26 (7,7 %); E-7, E-21 e E-25 foi identificado em 1/26 (3,85 %); coxsackievírus (CV) B-4 e B6 em 1/26 (3,85 %).

A espécie HEV-C compreendeu os seguintes sorotipos virais: o enterovírus 99 (EV-99) foi identificado em três das 26 amostras (11,5 %), seguido de EV-C identificado em 2/26 (7,7 %); poliovírus (PV) 2 e 3 identificado em 1/26 de cada (3,85 %); CV-A13 e CV-A20 identificado em 1/26 de cada (3,85 %).

Na espécie HEV-A foram identificados os seguintes sorotipos: CV-A5 em 2/26 (7,7 %) e CV-A10 em 1/26 (3,85 %).

**Figura 4.7. Frequência de enterovírus isolados a partir de amostras fecais de crianças menores de 15 anos, no HGM na cidade de Maputo, Moçambique.**



Dezesseis sorotipos de enterovírus humanos foram identificados. Amostra **32** foi identificada como poliovírus vacinal cepa Sabin 2 e a amostra **163** como poliovírus vacinal cepa sabin 3.

A **Tabela 4.3**, mostra com mais detalhes as características sociodemográficas dos participantes do presente estudo. Onde se pode constatar que, das 26 amostras positivas para o gênero *Enterovirus* foram analisadas estatisticamente. Entre os participantes, 9 (34, 6%) eram do sexo feminino e 17 (65,4 %) do sexo masculino. Entretanto, não houve diferença estatística significativa em relação à frequência de enterovírus, quanto ao sexo ( $p = 0.1539$ ).

Em relação às idades, as seguintes frequências foram observadas, 69,2 % na faixa etária dos 0 – 24 meses; 15,4 % na faixa etária dos 25 – 60 meses; 11,5% na faixa dos 61 – 120 meses e 3,8 % na faixa etária de 121 – 180 meses (3,8 %). A faixa etária dos 0 - 24 meses apresentou cerca de 70 % de amostras positivas para o gênero *Enterovirus*, e foi estatisticamente significativo ( $p < 0,0380$ ).

Enquanto que, no que concerne a frequência dos enterovírus humanos em relação ao tipo de alimentação nota-se que não há diferença estatística significativa, entre os três tipos de alimentação reportados. No que diz respeito às condições associadas nomeadamente, ao SIDA/HIV e desnutrição, em relação a presença de enterovírus, notou-se que não há diferença estatística significativa.

**Tabela 4.3. Características sociodemográficas dos participantes com amostras positivas para gênero *Enterovirus*.**

Número de amostras positivas	26 (100%)	<i>p</i>
<b>Sexo (%):</b>		
Feminino	9 (34,6 %)	0,1539
Masculino	17 (65,4%)	
<b>Faixas etárias em meses (%):</b>		
0 – 24	18(69,2 %)	0,0380
25 – 60	4 (15,4 %)	0,7503
61 – 120	3 (11,5 %)	0,5021
121 – 180	1 (3,8 %)	1,0000
<b>Tipo de alimentação (%):</b>		
Somente leite materno	2 (7,7 %)	1,0000
Mista	5 (19,2 %)	0,2167
Diversificada	19 (73,1%)	0,8604
<b>Condições associadas</b>		
SIDA/HIV	2 (7,7%)	0,4452
Desnutrição	9 (34,6 %)	0,0614

Os sinais e sintomas mais reportados nos participantes do estudo mostram que a maioria das manifestações clínicas ocorre, de forma similar, ou seja, ocorre para as espécies A, B ou C dos enterovírus, com ênfase para: a dor de cabeça, o vômito/nausea, a diarreia e a dificuldade de respirar. Apesar da similaridade, estes dados não foram estatisticamente significativos.

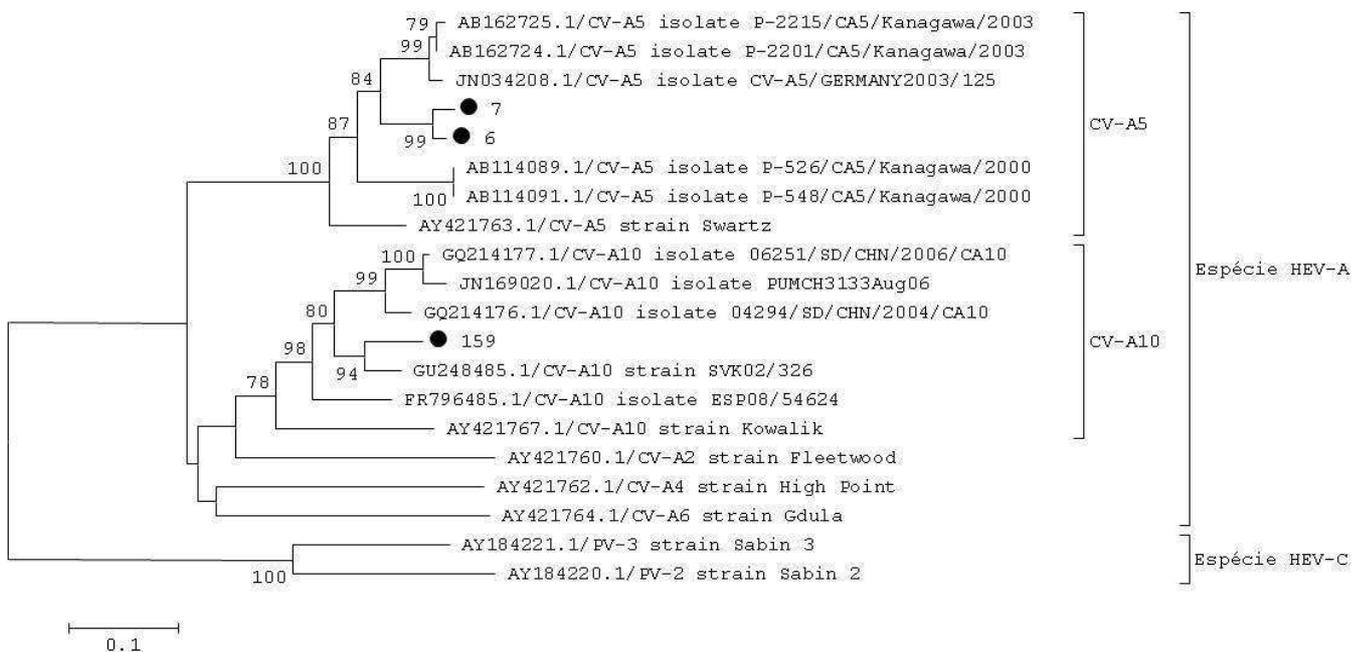
A **Tabela 4.4**, mostra a correlação entre as manifestações clínicas reportadas e as espécies B e C de Enterovírus humanos, não se fez a correlação da espécie A devido ao número menor de amostras positivas. Estes sinais e sintomas sugerem infecção no trato gastrointestinal e infecção respiratória.

**Tabela 4.4. Correlação entre manifestações clínicas, reportadas nos participantes e as espécies de Enterovírus humano identificados.**

Variáveis	HEV-A (n=3)	HEV-B (n=14)	HEV-C (n=9)	p*
Febre	3 (100 %)	13 (92,9 %)	9 (100 %)	0,8198
Vômito/Naúsea	3 (100 %)	9 (64,3 %)	5 (55,6 %)	0,9848
Tosse	0 (0 %)	11 (78,6 %)	6 (66,7 %)	0,8822
Diarréia	3 (100 %)	8 (57,1 %)	3 (33,3 %)	0,4003
Dificuldade de respirar	2 (66,7 %)	5 (35,7 %)	5 (55,6 %)	0,4172
Prostração	1 (33,3 %)	3 (21,4 %)	1 (11,1 %)	1,0000
Outros sintomas	3 (100 %)	7 (50 %)	6 (66,7 %)	0,7218

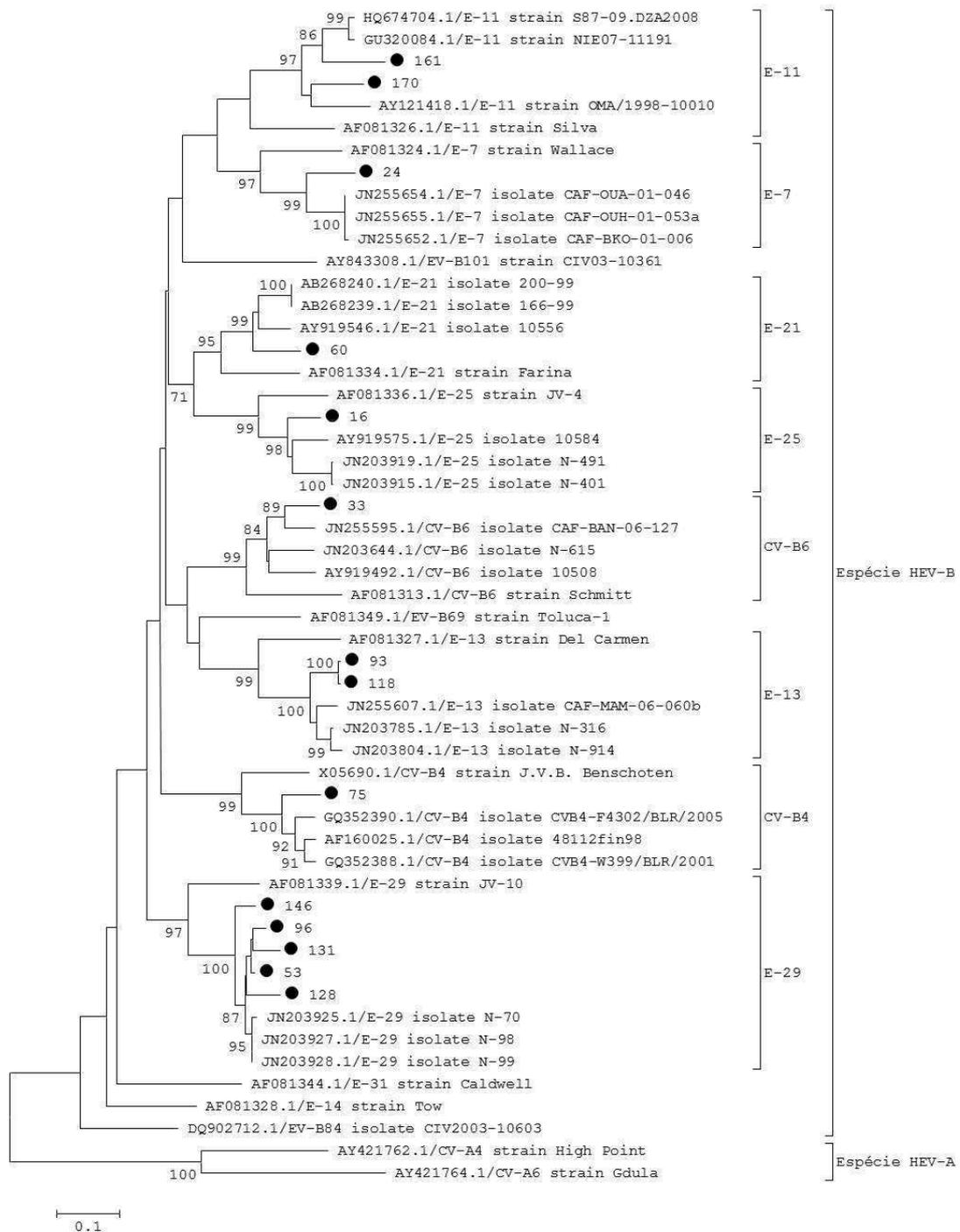
\*p= comparação de entre os HEV-B e HEV-C

A **Figura 4.8** - Árvore filogenética mostrando as amostras de número 6, 7 e 159, identificadas como enterovírus humanos da espécie A (HEV-A) e seu relacionamento com outros membros de enterovirus dessa mesma espécie.



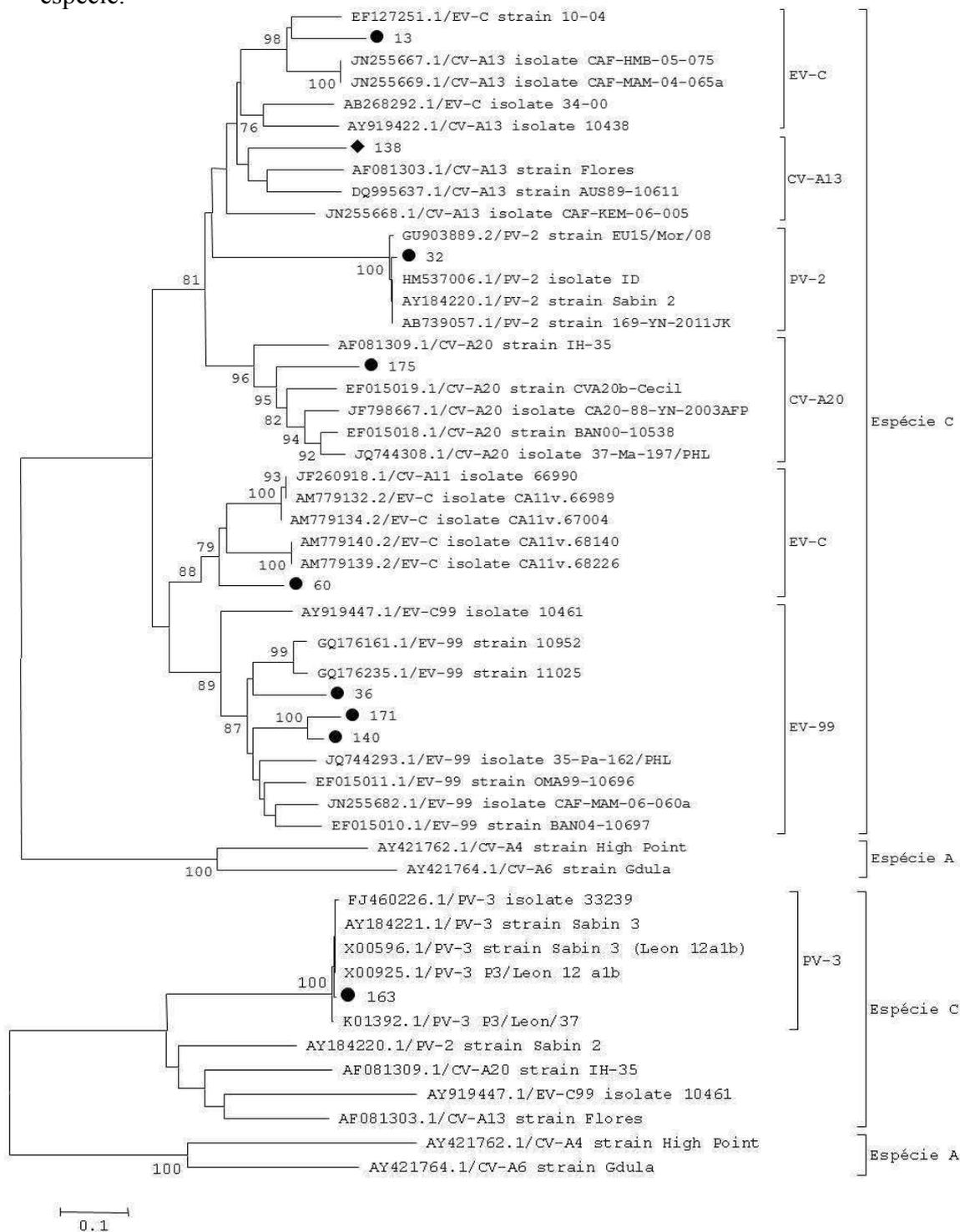
**Figura 4.8 - Árvore filogenética mostrando as amostras identificadas como enterovírus humanos da espécie A.**

A **Figura 4.9** - Árvore filogenética mostrando os enterovirus isolados pertencentes à espécie B (HEV-B) e seu relacionamento com outros membros de enterovirus dessa mesma espécie. As amostras 53, 96, 128, 131 e 146 correspondem ao Echovirus 29, o sorotipo mais frequentemente encontrado e que mostram maior similaridade com os E29 isolados da Índia.



**Figura 4.9** - Árvore filogenética mostrando os enterovirus isolados pertencentes à espécie B. O Echovirus 29, o sorotipo mais frequentemente encontrado.

A **Figura 4.10**, ilustra a árvore filogenética onde estão incluídos os enterovírus pertencente à espécie HEV-C isolados e seu relacionamento com outros vírus da mesma espécie.



**Figura 4.10** - Árvore filogenética mostrando os enterovírus isolados pertencentes à espécie C.

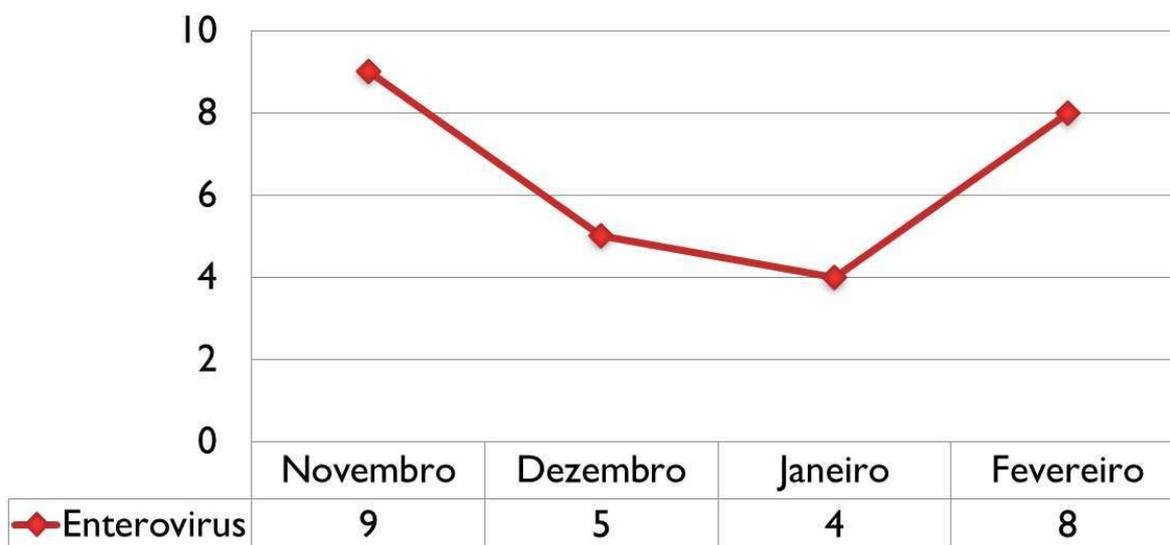
A **Tabela 4.5** mostra de forma sumarizada os sorotipos de enterovirus identificados e fornece informação relativa a alguns dados sociodemográficos e clínicos, bem como o grau de homologia entre os sorotipos identificados e os depositados previamente no GenBank.

**Tabela 4.5. Sorotipos de enterovirus identificados, e alguns dados sociodemográficos e clínicos de crianças menores de 15 anos, atendidas no HGM na cidade Maputo.**

<b>Amostra (n=26)</b>	<b>Idade (meses)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Tipo de alim</b>	<b>Sinais/ Sintomas reportados</b>	<b>Motivo de internação</b>	<b>Sorotipo viral</b>	<b>Homologia (%)</b>	<b>Nº de acesso ao GenBank</b>
<b>06</b>	11	M	3	fb, d, vô, dr, os	Desnutrição	CVA5	90 %	JN034208
<b>07</b>	22	M	3	fb, d, vô, pro, os	Desnutrição	CVA5	90 %	JN034208
<b>13</b>	14	M	2	fb,vô, rc, r n, dr	Malária	EVC	83 %	EF127251
<b>16</b>	53	F	3	fb, d, vô, dr, pro, to	Malária	E25	88 %	AY919575
<b>24</b>	6	M	2	fb, d, vô, dr, to	Desnutrição	E7	86 %	JN255655
<b>32</b>	1	M	1	fb, dr, to, os	BPN	PV* 2	99,7 %	AY184220
<b>33</b>	72	F	3	dc, d, to, os	Malária	CVB6	90 %	JN255595
<b>36</b>	15	F	3	fb, d, to, os	Desnutrição	EV99	82 %	GQ176162
<b>53</b>	30	M	3	fb, d, to, os	Desnutrição	E29	97 %	JN208928
<b>58</b>	16	M	3	fb, vô, to, dm	Malária	E21	87 %	AY919550
<b>60</b>	12	F	3	fb, vô, to, os	BPN	EVC	84 %	AM77914
<b>75</b>	70	M	3	fb, vô, to, os	Malária	CVB4	89 %	GQ352390
<b>93</b>	17	M	3	fb, d, vô, to	Desnutrição	E13	89 %	JN255607
<b>96</b>	62	F	3	fb, dr, to,os	Malária	E29	94 %	JN203928
<b>118</b>	16	M	2	fb, d, vô, dr, to	BPN e GEA	E13	91 %	JN255607
<b>128</b>	15	F	3	fb, pro, to, os	Desnutrição	E29	93 %	JN203928
<b>131</b>	37	F	3	fb, d, vô, os	Desnutrição	E29	93 %	JN203930
<b>138</b>	132	M	3	fb, dc, vô, pro	Malária	CVA13	77 %	DQ995637
<b>140</b>	12	F	3	fb, d, vô, os	GEA	EV99	84 %	EF015011
<b>146</b>	50	M	3	fb, dc, vô, os	Malária	E29	94 %	JN203939
<b>159</b>	7	M	2	fb, d, vô, dr, os	GEA	CVA10	87 %	JN255589
<b>161</b>	17	F	3	fb, d, vô, pro, to	Desnutrição	E11	87 %	JQ744301
<b>163</b>	1	M	1	fb, rc, to, dr	BPN	PV*3	99,7 %	AY184221
<b>170</b>	22	M	3	fb, to, dm, dr	BPN	E11	85 %	AY121418
<b>171</b>	20	M	3	fb, d, to, dr	BPN	EV99	81 %	JQ744293
<b>175</b>	9	M	2	fb, vô, to, dr	BPN	CVA20	82 %	EF015018

**Legenda:** **F** = Feminino; **M** = Masculino; Tipo de alimentação: **1** = Somente leite materno; **2** = Mista, **3** = Diversificada; **fb** = febre, **d** = diarreia, **vô** = vômito/nausea, **dr** = dificuldade de respirar, **os** = outros sintomas, **pro** = prostração, **rc** = resfriado comum, **r n** = rigidez da nuca, **to** = tosse, **dc** = dor de cabeça, **dm** = dores musculares; **BPN** = bronquiopneumonia; **GEA** = gastroenterite aguda, **%** = percentagem de identidade nucleotídica; **Nº** = número; **CVA** = coxsackievirus A; **CVB** = coxsackievirus B; **E** = echovirus; **EV** = enterovirus; **PV\*** = poliovirus vacinal cepa sabin.

Na **Figura 4.11** está demonstrado a distribuição temporal das amostras positivas para os enterovírus humanos. Nota-se que os enterovírus estavam presentes em todos os meses da coleta, com a seguinte distribuição: novembro (9) 34,6 %; fevereiro (8) 30,8 %, dezembro (5) 19,2 % e por fim Janeiro com (4) 15,4 % de amostras positivas.

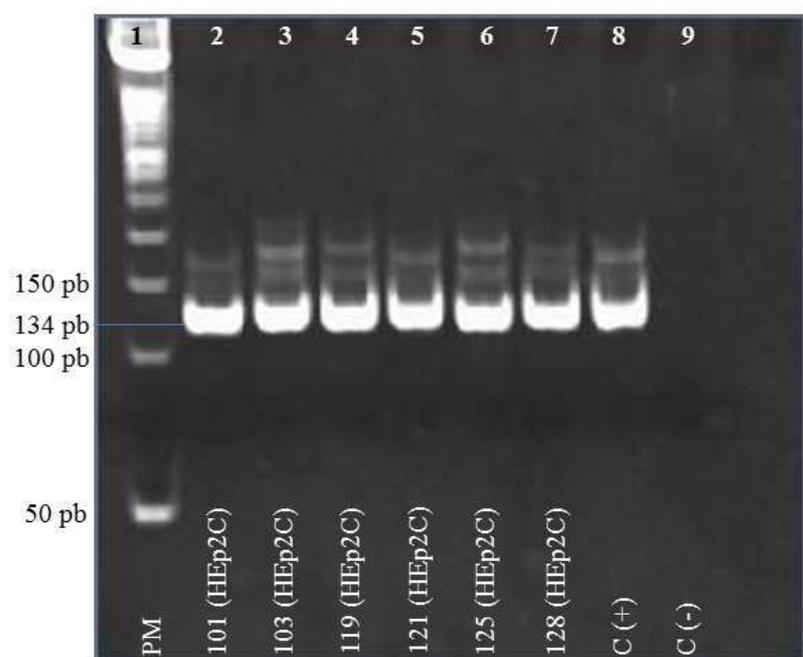


**Figura 4.11. Distribuição temporal amostras positivas para enterovírus humanos.** O mês de novembro teve muitas amostras positivas e por sua vez janeiro com poucas amostras positivas.

#### 4.8 Pesquisa de Adenovírus humanos

As amostras negativas pela RT-PCR PAN-EV (**Tabela 4.2**), foram submetidas a uma PCR para pesquisa de Adenovírus, porque as células da linhagem HEp2C, apresentaram um efeito citopático fortemente sugestivo a adenovírus durante o isolamento viral em cultura de célula, pois estes vírus, são facilmente isolados nesta linhagem celular.

Entre as 23 amostras negativas, ao gênero *Enterovirus*, posteriormente pesquisados os adenovírus denominados, foram pesquisadas através de uma reação de PCR, usando par de iniciadores específicos (AD1 e AD4, **Anexos 4**), para detetar Adenovírus humanos. Após PCR de e corrida electroforética em gel de acrilamida, um fragmento de 134 pb foi observado em 20 das 23 amostras analisadas. O padrão eletroforético e a amplificação do fragmento de 134 pb está demonstrado na **Figura 4.12**. As 20 amostras positivas para adenovírus correspondem a 11,2 % das 178 amostras utilizadas neste estudo.



**Figura 4.12.** Perfil eletroforético obtido, durante a PCR em gel de acrilamida, para **Adenovírus humanos, utilizando os iniciadores AD1-AD4 (134pb)**. Poço: 1 – Marcador de peso Molecular de 50 bp. 2 a 7 – Amostras Positiva. Poço: 8 e 9 – Controles positivo (8) e Negativo (9).

Entre os participantes, com Adenovírus humano positivo, havia 10 (50 %) do sexo feminino e 10 (50 %) do sexo masculino. Os sinais e sintomas mais reportados foram: febre, tosse, dificuldade respiratória, vômito/náusea e diarreia.

Pelas informações sumarizadas na **Tabela 4.6**, constata-se que, não houve diferença estatística significativa em relação a frequência de adenovírus humanos, quanto ao sexo ( $p = 0,8117$ ). No que concerne as idades, nas faixas etárias de 0 – 24 meses; 25 – 60 meses e 61 – 180 meses, não houve diferença estatística significativa em relação a frequência dos adenovírus ( $p = 0,3359$ ). Quanto tipo de alimentação “Diversificada” e a presença de adenovírus nota-se que há uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0005$ ).

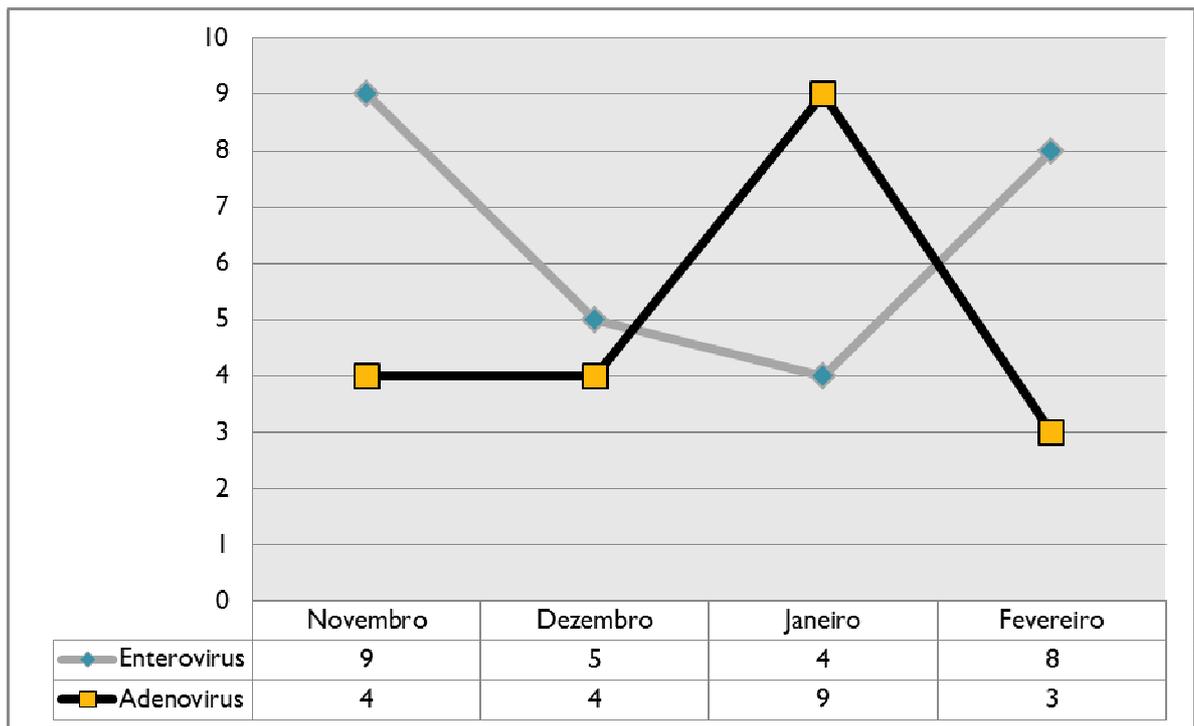
**Tabela 4.6. Principais características sociodemográficas e clínicas dos participantes, que tiveram as amostras positivas para adenovírus humanos.**

Amostra (n=20)	Sexo*	Idade (meses)**	Tipo de alimentação***	Sinais/ Sintomas reportados	Motivo de internação
09	M	4	3	fb, to, dr, dm	Desnutrição
40	F	62	3	fb,pro, dc, dm, dr	Malária
42	M	8	3	fb, pro, vô, dr, to	GEA
49	M	41	3	fb, d, to, os	Outros motivos
70	F	73	3	fb, dc, to, os	Malária
72	F	24	3	fb, d, to, os	Desnutrição
75	M	70	3	fb, vô, to, os	Malária
91	F	56	3	fb, d, vô, os	Malária
100	F	72	3	fb, d, dc, vô, os	Malária
101	F	58	3	fb, pro, to, os	BPN
103	M	13	3	fb, to, dm, dr	BPN
105	M	86	3	fb, d, dc, os	GEA e Malária
119	M	84	3	fb, d, vô, to, dr	Malária
121	M	30	3	fb, to, dr, os	BPN
125	F	32	3	fb, d, vô,os	GEA
128	F	15	3	fb, pro, to, os	Desnutrição
129	M	73	3	fb, dc, dm, to, os	Malária
142	F	8	3	fb, d, vô, os	GEA
149	M	25	3	fb, vô, to, dr	BPN
174	F	17	3	fb, dr, to, os	BPN

\* $p = 0,8117$ ; \*\*  $p = 0,3359$ ; \*\*\*  $p = 0,0005$

**Legenda:** **F** = Feminino; **M** = Masculino; Tipo de alimentação: **1** = Somente leite materno, **2** = Mista, **3** = Diversificada; **fb** = febre, **d** = diarréia, **vô** = vômito/nausea, **dr** = dificuldade de respirar, **os** = outros sintomas, **pro** = prostração, **rc** = resfriado comum, **rn** = rigidez da nuca, **to** = tosse, **dc** = dor de cabeça, **dm** = dores musculares; **BPN** = bronquiopneumonia, **GEA** = gastroenterite aguda.

A distribuição temporal das amostras positivas para adenovírus e enterovírus humanos, esta demonstrada na **Figura 4.11**. Amostras positivas foram presentes em todos os meses da coleta, onde pode notar-se que o mês em que teve muitas amostras positivas para adenovírus foi janeiro, enquanto que novembro, dezembro e fevereiro, tiveram muitas amostras positivas para os enterovírus.



**Figura 4.13. Distribuição temporal das amostras positivas aos adenovírus e enterovírus humanos.** O mês que teve poucas amostras positivas foi dezembro (9), enquanto que novembro e janeiro tiveram muitas amostras positivas (13).

Vale destacar que duas amostras apresentaram uma co-infecção (enterovírus e adenovírus, amostras **75** e **128** – **Tabela 4.2**), o que corresponde a 1,1 % (2/178) das amostras utilizadas no presente estudo. Os dois participantes com a co-infecção apresentavam um quadro de infecção respiratória, apesar de terem sido internados um por motivos distintos, Malária e Desnutrição, respectivamente. A amostra **156** apresentou efeito citopático em cultura de células, contudo foi negativa para enterovírus e adenovírus humanos.

## 5. DISCUSSÃO

Os enterovírus humanos são espécies do gênero *Enterovirus* e há relatos de cerca de 120 sorotipos que estão classificados em quatro espécies, designados de A a D (*Picornavirus Homepage*). Estes agentes infectam milhões de indivíduos no mundo inteiro e apresentam uma grande variedade de quadros clínicos. A maioria das infecções por enterovírus caracteriza-se por apresentar manifestações assintomáticas e os vírus podem ser excretados por indivíduos saudáveis (Cherry, 1981; Melnick, 1996).

Estes vírus estão associados a diversas síndromes clínicas, que vão desde a febre inespecífica e resfriado comum até doenças mais graves como a meningite asséptica, as encefalites, as paralisias, as miocardites, a conjutivite hemorrágica, a “sepsi like” neonatal, entre outros quadros clínicos (Pallansch e Roos, 2001; da Silva et al. 2005; Minor e Muir, 2009).

### *Caraterísticas sociodemográficas e clínicas da amostra*

Este é o primeiro estudo que reporta a existência e a circulação de enterovírus humanos em Moçambique. No presente estudo, constatou-se que não havia diferença estatística significativa, entre infecção por enterovírus quanto ao sexo ( $p = 0,1539$ ); apesar de um número relativamente maior de participantes do sexo masculino (1,8:1); dado similar constatado por Dechkum et al. (1998); contudo Moore et al. (1984) e Gondo et al. (1995), reportaram que a infecção por enterovírus ocorre frequentemente em indivíduos do sexo masculino, quando comparados ao sexo feminino. Segundo Pallansch e Roos, (2001), a maior prevalência entre o sexo masculino é em função do tempo de excreção viral que é mais longo, e ainda o alto título viral e de uma maior exposição ao vírus.

Segundo Pallansch e Roos (2001) os grupos etários, apresentam diferentes susceptibilidades, gravidade da doença e o prognóstico da infecção por enterovírus. Nos 26 participantes que tiveram as amostras positivas para enterovírus, 18 eram da faixa etária dos 0 - 24 meses; quatro eram da faixa dos 25 - 60 meses; três da faixa de 61 – 120 meses; e por fim, uma da faixa dos 121 – 180 meses. A faixa etária com mais amostras positivas foi de 0 aos 24 meses, o que está de acordo com Pallansch e Roos (2001), que diz, que o pico de infecções por enterovírus ocorre nos primeiros dois anos de idade; e a diferença foi estatisticamente significativa, entre frequência de enterovírus quanto a faixa etária dos 0 - 24 meses de idade ( $p < 0.0380$ ).

O tipo de alimentação quando analisado em relação a infecção por enterovírus, nota-se que não há diferença estatisticamente significativa; apesar da maioria dos vírus ter sido identificada em participantes com alimentação diversificada. Este fato pode ser justificado pelas vias de transmissão que estes vírus apresentam: oro-fecal quer, pelo consumo ou ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes, autoinoculação pela boca, nariz e olhos; aliadas a baixas condições sanitárias, nas zonas de origem ou habitação (Pallansch e Roos, 2001).

A relação entre o tipo de vírus e os sinais e sintomas clínicos é bastante variável e pode depender das características dos hospedeiros, tais como uma exposição prévia a enterovírus e idade em que foi infectado (Iturriza-Gómara et al. 2006); este fato dificulta claramente dizer que os sinais e sintomas reportados são provocados por este ou outro sorotipo (da Silva et al. 2005). Pois a excreção de enterovírus não implica necessariamente associação com a doença, uma vez que a excreção pode ocorrer em indivíduos assintomáticos; especialmente em países em vias de desenvolvimento, onde as infecções por enterovírus são caracterizadas como silenciosas (Cherry, 1981; Melnick, 1996).

Os sinais e sintomas mais reportados em participantes do estudo com amostras positivas para enterovírus foram: febre, vômito/nausea, tosse, diarreia e dificuldade de respirar; sintomas similares já foram reportados em outros estudos (Santos, 2005; Lo et al. 2010).

#### *Isolamento dos enterovírus humanos em cultura de células*

Os enterovírus são isolados em cultura de células, e neste estudo foram isolados nas linhagens celulares recomendadas pela OMS. São elas: RD, HEp2C e L20B (WHO, 2004). Os isolados foram posteriormente identificadas por amplificação e sequenciamento da região do gene que codifica a proteína VP1 dos enterovírus, a qual está relacionada com o sorotipo viral, através de pares de iniciadores e várias reações de RT-PCR e a análise das sequências (Iturriza-Gómara et al. 2006).

Neste estudo a frequência de enterovírus humanos foi de 14,6 %; em crianças menores de 15 anos de idade. A frequência dos enterovírus detectados neste estudo, está de acordo com outros estudos, conduzidos por Santos et al. (2002) que reportou 15 %; Witsø et al. (2006) reportou 11,8 %; Kelly et al. (2006) reportou 16 %; Roh, et al. (2009) reportou 16,9 %; Afifi et al. (2009) reportou 17,6 %; apesar de em alguns estudos ter reportado prevalências acima

dos 20 %, como o reportado por Iturriza-Gómara et al. (2006) 24.6 % e 26 % por Saeed et al. (2007).

A frequência de enterovírus em crianças com quadro de SIDA/HIV positiva foi de 7,7 %, abaixo do reportado em outros estudos em países africanos; Palvov et al. (2006) reportou 32,9 % na África do Sul; Manirakiza et al. (2010) encontrou uma frequência de 36,8 % na República Centro Africana e Khetsuriani et al. (2009) reportou 54,7% de enterovirose humanas no Quênia, contudo estes estudos eram do tipo coorte e não transversais.

O enterovirus humano B (HEV-B) foi a espécie mais identificada neste trabalho, apesar de não ter sido estatisticamente significativo. Resultados similares já foram reportados por Lo et al. (2010) e Bessaud et al. (2012). Contudo neste estudo não foi identificado, a espécie HEV-D; este fato provavelmente pode ser pelo número reduzido de sorotipos desta espécie quanto comparado as outras espécies de enterovirus humanos A, B e C (*Picornaviridae Homepage*).

Métodos para a identificação de sorotipos de enterovírus que têm sido descritos, são baseados na amplificação e sequenciamento das regiões que codificam o gene da VP1, o qual está correlacionado com o sorotipo viral. A caracterização dos sorotipos virais usando métodos moleculares normalmente requer o uso de diferentes pares de iniciadores em várias reações de PCR e a análise da sequência de todo gene que codifica a proteína VP1, ou de sequências parciais (Iturriza-Gómara et al. 2006).

#### *Sequenciamento parcial do gene que codifica a proteína VP1*

Neste trabalho, foi realizado o sequenciamento parcial do gene que codifica para a proteína VP1 para a identificação dos sorotipos dos enterovírus isolados. Esta região genômica foi escolhida porque a VP1 é a maior proteína do capsídeo viral, que compreende o principal epítipo dos enterovírus, possuindo vários sítios antigênicos e determinantes de neutralização específicos (Hogle et al. 1985; Oberste et al. 1999).

O uso de par de iniciador degenerado amplamente reativo que amplifica a VP1 e seguido do sequenciamento nucleotídico para a caracterização dos vírus isolados em cultura de célula, reduz o número de reações de PCR para a identificação do sorotipo viral (Oberste et al. 2003).

Os resultados da identificação molecular dos enterovírus isolados neste estudo, demonstra uma grande diversidade de sorotipos identificados (16 sorotipos), onde o echovírus 29 foi o vírus mais isolado (5/26 – 19,2 %). Outros enterovírus também foram

identificados neste estudo, em menor frequência, como echovírus 99 (3/26 - 11,5 %), coxsackievírus A5, echovírus sorotipos 11, 13 e 29 e enterovírus C (2/26 - 7,7 %), coxsackievírus sorotipos A10, A13, A20, B4 e B6 (1/26 - 3,85 %), echovírus sorotipos 7, 13, 21 e 25 (1/26 - 3,85 %), e poliovírus vacinal cepa Sabin 2 e 3 (1/26 - 3,85 %), respectivamente.

#### *Análise filogenética das sequências obtidas*

A análise filogenética das sequências obtidas após o alinhamento apresentou as seguintes identidades nucleotídicas:

As amostras **6** e **7** apresentaram 90 % de identidade nucleotídica com um exemplar de *Coxsackievirus A5* isolado da cepa CV-A5/GERMANY2003/125 na Inglaterra em 2003 por Simonen-Tikka et al. (2011); a amostra **13**, identificada como *Enterovirus C* apresentou 83 % de identidade com o isolado de 2007 na República Democrática do Congo, por Junttila et al. (2007); a amostra **16** apresentou 88 % de identidade nucleotídica com um exemplar de *Echovirus 25* com um isolado de 2005, por Oberste et al. (2006); a amostra **24** identificada como *Echovirus 7* apresentou 86 % de identidade nucleotídica com um isolado na República Centro Africana, por Bessaud et al. (2012).

A amostra **33** apresentou 90 % de identidade nucleotídica com um exemplar *Coxsackievirus B6* isolado na República Centro Africana, por Bessaud et al. (2012); a amostra **36** identificada como *Enterovirus 99* teve 82 % de identidade com uma cepa 10953 VP1, isolado em Quênia por Khetsuriani et al. (2009); a amostra **53** apresentou 97 % de identidade com uma amostra de *Echovirus 29* isolado na Índia, por Rao e Subbanna (2012); a amostra **58** teve 87 % de identidade com uma amostra de *Echovirus 21* isolada em 2005, por Oberste et al. (2006); a amostra **60** identificada como *Enterovirus C* isolado em Madagascar por Rakoto-Andrianarivelo et al. (2007); e a amostra **75** apresentou 89 % de identidade com uma amostra de *Coxsackievirus B4* isolada na Belorússia por Amvrosieva et al. (2009).

A amostra **93**, identificada como *Echovirus 13* apresentou 89 % de identidade nucleotídica com um isolado da República Centro Africana, por Bessaud et al. (2012); a amostra **96** identificada como *Echovirus 29* teve 94 % de identidade com uma cepa isolada na Índia, por Rao e Subbanna (2012); a amostra **118** apresentou 91 % de identidade nucleotídica com um exemplar *Echovirus 13* isolado na República Centro Africana, por Bessaud et al. (2012); as amostras **128** e **131** identificadas como *Echovirus 29* tiveram 93 % e 92 % de identidade com uma cepa N-99 isolado na Índia, por Rao e Subbanna (2012).

A amostra **138** identificada como *Coxsackievirus A13* apresentou 77 % de identidade nucleotídica com a cepa AUS89-10611, isolada por Brown et al. (2009); a amostra **140** apresentou 84 % de identidade com uma amostra *Enterovirus 99* da cepa OMA99-10696, isolada por Brown et al. (2009); a amostra **146** identificada como *Echovirus 29* teve 94 % de identidade da cepa N-678 isolada na Índia, por Rao e Subbanna (2012); a amostra **159** (*Cosaxckievirus A10*) apresentou 87 % de homologia com uma amostra da cepa CAF-SAN-06-064, isolada por Bessaud et al. (2012), na República Centro Africana; e a amostra **161** identificada como *Echovirus 11* apresentou 87 % de identidade nucleotídica com a cepa 27-LP-126/PHL das Filipinas, isolado por Apostol et al. (2012).

A amostra **170** (*Echovirus 11*) apresentou 85 % de homologia com uma amostra da cepa OMA/1998-10010, isolada por Oberste et al. (2003); a amostra **171** teve 81 % de identidade nucleotídica com uma cepa 35-Pa-162/PHL, isolada por Apostol et al. (2012); e a amostra **175** identificada como *Cosaxckievirus A20* apresentou 82 % de homologia com uma amostra da cepa BAN00-10538, isolado por Brown et al. (2009).

O sequenciamento completo do gene que codifica a proteína VP1 dos enterovírus humanos é comumente utilizado para detectar mutações que possam estar associadas a reversão da virulência nos poliovírus de origem vacinal. Como duas amostras foram identificadas como poliovírus o sequenciamento completo foi realizado no gene que codifica a proteína VP1. A análise filogenética dessas duas sequências identificou que a amostra **32** como poliovírus vacinal cepa Sabin sorotipo 2; enquanto que a amostra **163** como poliovírus de origem vacinal sorotipo 3. Ambas as amostras apresentaram 99% de identidade nucleotídica com a cepa Sabin 2 e Sabin 3 isoladas por Rezapkin et al. (2002).

Contudo, na **amostra 32**, apesar do participante ter recebido a dose da vacina oral trivalente para pólio, este fato pode ser explicado pela replicação mais eficiente do poliovírus vivo atenuado tipo 2 no trato gastrointestinal, entre os sorotipos que compõe a vacina (Modlin, 1995).

Na **Amostra 163**, segundo a informação coletada durante o questionário, o participante não recebeu a vacina contra a poliomielite. Este evento é previsível em países ou áreas onde a vacina oral trivalente para pólio é utilizada, o que representa uma das vantagens da vacinal oral, por permitir a expansão do vírus vacinal em outros indivíduos e ao meio ambiente, conferindo proteção por indução à produção de anticorpos não apenas séricos, mas também a uma resistência intestinal e rapidez com que as pessoas vacinadas desenvolvem uma imunidade longa (Melnick, 1996; da Silva et al. 2005).

Estes achados revelam a existência uma diversidade de enterovírus humanos a circular na cidade de Maputo, o sequenciamento genômico revelou que estes vírus apresentaram maior semelhança com isolados da região central da África e sudeste Asiático, este facto provavelmente pode ser justificado pelo elevado número de emigrantes que Moçambique tem recebido nos últimos anos, alguns oriundos de países destas regiões (Portaldogoverno homepage, 2011; Notícias, 2011).

### *Adenovírus humanos*

Os adenovírus humanos estão comumente associados a infecções respiratórias. Contudo, dependendo do sorotipo infectante, pode causar um largo espectro de doenças incluindo gastroenterites, conjuntivites, cistitis e infecções exantemáticas não específicas (Wadell, 1984; Wadell, 1999). O impacto dos adenovírus em gastroenterites na África ainda não está estabelecido, com a exceção da África do Sul, onde a epidemiologia dos adenovírus entéricos está bem estabelecida (Moore et al. 1998; Moore et al. 2000).

E este é o primeiro estudo que reporta a existência e a circulação dos adenovírus humanos em Moçambique. No presente estudo, constatou-se que não havia diferença estatística significativa, entre infecção por adenovirose quanto ao sexo ( $p = 0,8117$ ); dado similar constatado por Audu et al. (2002).

A identificação de adenovírus em crianças maiores de 24 meses, em contraste com os achados de muitos estudos, em que crianças menores de 24 meses foram consideradas vulneráveis a infecção (Hársi et al. 1995; Nimzing et al. 2000; Basu et al. 2003); este achado de identificação de adenovírus em crianças maiores de 24 meses, pode ser atribuído ao tipo de alimentação, pois no grupo com alimentação diversificada no caso do estudo designado “outros”, notou-se que há uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.0005$ ), sendo a via de transmissão oral-fecal fundamental neste grupo etário, aliado às condições socioeconômicas baixas; como constatado por Aminu et al. (2007).

Os adenovírus neste estudo foram isolados nas linhagens celulares: HEp2C e L20B; previamente reportados em outros estudos por permitir o seu isolamento por; Audu et al. (2002), e Gonçalves et al. (2008).

A frequência observada neste estudo foi de 11,2 %; em crianças menores de 15 anos de idade. Não foi possível identificar as espécies dos isolados por falta de iniciadores

específicos; contudo o par de iniciadores utilizados é específico para os membros do gênero *Mastadenovirus*, pertencentes os adenovirus humanos.

A frequência de adenovirus encontrada neste estudo, está de acordo com outros estudos, conduzidos por Steele et al. 1998 (7,8 % na Africa do Sul); Audu et al. 2002 (16,7 % na Nigeria); Basu et al. 2003 (7,8 % em Bostwana); Kamel et al. 2009 (10,4 % no Egipto); e Verheyen et al. 2009 (12,9 % em Benin), apesar de, prevalências altas já terem sido reportados na África por Mhalu et al. 1988 (23 % na Tanzania) e Aminu et al. 2007 (17,6 e 23 %, respectivamente na Nigeria). Na maioria dos estudos acima citados foram utilizados testes imunoenzimáticos para a identificação dos adenovirus.

Adenovirose foram identificados em 6,7 % (12/ 178) participantes do estudo apresentando quadro de infecção respiratória em amostras não diarréicas e 4,5 % (8/178) com quadro de gastroenterite, em amostras diarréicas. Contudo; Audu et al. (2002) e Aminu et al. (2007) mostraram prevalência maior de adenovirus em amostras diarréicas quando comparado as não diarréicas.

A co-infecção com enterovirus foi observada em 1,1 % (2/178), das amostras infectadas por adenovirus; achados em estudos anteriores há informação, e se ocorrem é em baixa frequência, apenas têm se reportado baixas frequências de co-infecção entre adenovirus que causam gastroenterites com astrovirus e rotavirus (Marx et al. 1998; Nimzing et al. 2000).

A amostra **156**, isolada em cultura de célula na linhagem HEp2C foi negativa tanto para enterovirus, quanto a adenovirus humanos; provavelmente seja um outro virus que tenha sido responsável pelo efeito citopático. Segundo Santos e Benati (2008), Couceiro e de Albuquerque (2008), virus como: herpes simplex e sincicial respiratório são isolados nesta linhagem celular, entretanto não foi possível realizar a identificação.

## 6. CONCLUSÕES

- O isolamento viral em cultivo celular foi verificado em todas as linhagens utilizadas, apesar de não ter sido homogêneo.
- A frequência dos enterovírus identificados no estudo foi de 14,6 %, sendo o Echovírus 29 o mais prevalente.
- No presente estudo, foi constatado que não havia diferença estatística significativa, entre infecção por enterovírus quanto ao sexo.
- Constatou-se que há uma diferença estatística significativa, entre infecção por enterovírus quanto a faixa etária dos 0 – 24 meses.
- Em relação ao tipo de alimentação quando analisado, quanto a infecção por enterovírus, notou-se que não há diferença estatística significativa.
- A relação entre as espécies identificadas e os sinais e sintomas reportados foi bastante similar, tornando difícil estabelecer a correlação entre a sintomatologia clínica e a espécie.
- Foram identificados no estudo 11,2 % de adenovírus humanos nas amostras.

## **7. PERSPECTIVAS**

- Implantar a rotina de diagnóstico em cultura celular para enterovírus humanos, no Instituto Nacional de Saúde, em Moçambique;
- Implantar a vigilância epidemiológica dos enterovírus na cidade de Maputo, Moçambique;
- Realizar a identificação dos adenovírus humanos isolados, em relação aos sorotipos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afifi SS, Zaki SA, Mohamed AF, Hosseiny HE. Isolation and identification of non-polio enteroviruses from children in different Egyptian governorates. *Aust J Basic & Appl Sci* 2009; 3(4): 3230-3238.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990. v. 215, p. 403-410.

Aminu M, Ahmad AA, Umoh JU, de Beer MC, Esona MD, Steele AD. Adenovirus infection in children with diarrhea disease in Northwestern Nigeria. *Ann Afr Med* 2007. 6:168-73.

Amvrosieva TV, Paklonskaya NV, Biazruchka A, Dziadziulia KL, Bohush ZF, Kazinetz ON. Molecular epidemiology of enterovirus infection in Belarus. Unpublished, Submitted (02-JUL-2009). *Virus Ecology and Epidemiology* 2009. Belarusian.

Apostol LN, Imagawa T, Suzuki A, Masago Y, Lupisan S, Olveda R, et al. Genetic diversity and molecular characterization of enteroviruses from sewage-polluted urban and rural rivers in the Philippines. *J Virus Genes* 2012; (2012) In press.

Audu R, Omilabu AS, Peenze I, Steele DA. Isolation and identification of Adenovirus recovered from the stool of children with diarrhoea in Lagos, Nigeria. *African Journal of Health Sciences* 2002; 9:105-111.

Baltimore D, Girard M. An intermediate in the synthesis of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci* 1996; USA (S) 6: 741 – 746.

Baltimore D. The replication of picornavirus. In the *Biochemistry of viruses*. Marcel Dekker, New York 1969; p 101 – 176.

Basu G, Rossouw J, Sebunya TK, Gashe BA, De Beer M, Dewar JB, et al. Prevalence of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection in young children with gastroenteritis in gaborone, Botswana. *East African Medical Journal* 2003 Dez; vol. 80 No. 12.

Bessaud M, Pillet S, Ibrahim W, Joffret ML, Pozzetto B, Delpyroux F, et al. Molecular characterization of human enteroviruses in the Central African Republic: uncovering wide diversity and identification of a new human enterovirus A71 genogroup. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (5), 1650-1658.

Brown BA, Maher K, Flemister MR, Naraghi-Arani P, Uddin M, Oberste MS, et al. Resolving ambiguities in genetic typing of human enterovirus species C clinical isolates and identification of enterovirus 96,99 and 102. *J Gen Virol* 2009; (PT7), 1713-1723.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention: Enterovirus surveillance-United States, 2002-2004. *JAMA* 2006; 295:1993-1994.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention, Homepage. Disponível no endereço electrónico: [www.cdc.gov/epiinfo](http://www.cdc.gov/epiinfo) (Acesso 09:44 minutos, 02/03/11). 2010.

Cherry JD. Nonpolio enteroviruses: coxsackieviruses, echoviruses and enteroviruses. In: Feigin RD, Cherry JD, eds. *Textbook of pediatric infectious diseases*. Philadelphia: WB Saunders, 1981; 1316 – 1365.

Chonmaitree T, Mann L. Respiratory infections. In: Rotbard HA, ed *Human Enteroviruses Infections*. Washington, DC: ASM Press, 1995:255-270.

Conceição C, Cardoso N, Gujarl L, Cliff J, Novela M 2011. Investigação de Poliomielite por Poliovirus Derivado da Vacina em Moçambique, 2011. Short communication, 1º Congresso Nacional de Saúde Pública.

Costa EV. Sequenciamento e análise genômica do Poliovirus tipo 1, cepa LS-c, precursora imediata da vacina Sabin 1. Rio de Janeiro: IOC / FIOCRUZ. 72p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. 1999.

Couceiro JNSS, de Albuquerque MCM. Viroses Respiratórias. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Introdução à Virologia Humana*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan; 2008. p. 371-387.

da Silva EE, De Azevedo JRM, Costa EV. Enterovirus de Importância Médica. In: Coura JR. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. V 2. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan; 2005. p. 1681 – 1700.

Dalldorf G, Melnick JL. Coxsackieviruses. In: Horsfall FL Jr, Tamm I, eds. *Viral and rickettsial infections of man*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1965: 474-512.

Dechkum N, Pangsawan Y, Jayavasud C, Saganwongse S. Coxsackie B virus infection and myopericarditis in Thailand, 1987–1989. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998; 29:273–276.

Ehlers MM, Grabow WOK, Pavlov DN. Detection of enteroviruses in untreated and treated drinking water supplies in South Africa. *Water Research* 2005; 39: 2253–2258.

Gonçalves JLS, Hubinger MG, Santos NSO, Ferreira DF. Viroses do sistema nervoso central. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Introdução à Virologia Humana*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan; 2008. p. 371-387.

Gondo K, Kusuhara K, Take H, Ueda K. Echovirus type 9 epidemic in Kagoshima, southern Japan: Seroepidemiology and clinical observation of aseptic meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:787–791.

Gujral, L & Mabote, A 2009. Manual de Vigilância Epidemiológica das Paralisias Flácidas Agudas e Pólio. Ministério da Saúde, Direcção Nacional de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia, 3. ed. Maputo: MISAU; 2009. p.1-87.

Hall CE, Cooney MK, Fox JP. The Seattle virus watch program. I. Infection and illness experience of virus watch families during a communitywide epidemic of echovirus type 30 aseptic meningitis. *Am J Public Health Nations Health* 1970; 60:1456–1465.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp* 1999; Ser., 41: 95– 8.

Hársi CM, Rolim DP, Gomes SA, et al. Adenovirus genome types isolated from stools of children with gastroenteritis in São Paulo. Brazil. *J Clin Microbiol* 1995; 45:127-134.

HGM. Relatório Anual. Hospital Geral de Mavalane. Janeiro de 2011. 2010.

Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 29 Å resolution. *Science* 1985; 229: 1358-65.

Instituto Nacional de Estatística 2009. Relatório Final do Inquérito sobre Indicadores Múltiplos 2008. Direcção de Estatísticas Demográficas, Vitais e Sociais. Maputo. Moçambique. 244pp.

Iturriza-Gómara M, Megson B, Gray J. Molecular detection and characterization of human enteroviruses directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing. *J Med Virol* 2006; V 78: 243–253.

Jenista JA, Powell KR, Menegus MA. Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J Pediatr* 1984; 104: 685–690.

Junttila N, Leveque N, Kabue JP, Cartet G, Mushiya F, Muyembe-Tamfum JJ, et al. New enteroviruses, EV-93 and EV-94, associated with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo. *J Med Virol* 2007; 79 (4), 393-400.

Kamel AH, Ali MA, El-Nady HG, De Rougemont A, Pothier P, Belliot G. Predominance and Circulation of Enteric Viruses in the Region of Greater Cairo, Egypt. *Journal Of Clinical Microbiology* 2009 Apr; Vol. 47, No. 4. 1037–1045.

Kelly H, Brussen KA, Lawrence A, Elliot E, Pearn J, Thorley B. Polioviruses and other enteroviruses isolated from faecal samples of patients with acute flaccid paralysis in Australia, 1996–2004. *Journal of Paediatrics and Child Health* 2006; 42. 370–376.

Khetsuriani N, Quiroz ES, Holman RC, Anderson LJ. Viral meningitis-associated hospitalizations in the United States, 1988–1999. *Neuroepidemiology* 2003; 22, 345–352.

Khetsuriani N, Helfand R, Pallansch M, Kew O, Fowlkes A, Oberste MS, et al. Limited duration of vaccine poliovirus and other enterovirus excretion among human immunodeficiency virus infected children in Kenya. *J BMC Infect* 2009; Dis. 9, 136.

King AMQ, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyytia T, Knowles NJ, et al. Family *Picornaviridae*. In: Van Regenmortel M HV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, et al. *Virus Taxonomy: Classification And Nomenclature Of Viruses. Seventh Report Of The International Committee On Taxonomy Of Viruses*. San Diego: Academic Press. 2000. p. 657 - 683.

Knowles NJ, Hovi T, Hyytiä T, King AMQ, Lindberg M, Pallansch MA, et al. *Picornaviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz, EJ, editors. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier, 2011. p. 855-880.

Lo C, Wu K, Lin M, Chen C, Ho DM, Tang R, Chan Y. Application of a Molecular Method for the Classification of Human Enteroviruses and its Correlation with Clinical Manifestations. *J Microbiol Immunol Infect* 2010; 43(5): 354–359.

Manirakiza A, Picard E, Ngbale R, Menard D, Gouandjika-Vasilache I. OPV strains circulation in HIV infected infants after national immunisation days in Bangui, Central African Republic. *BMC Research Notes* 2010; 3:136. 2010.

Marx FE, Taylor MB, Grabow WOK. The prevalence of human astrovirus and enteric adenovirus infection in South African patients with gastroenteritis. *S Afr J Epidemiol Infect* 1998; 13:5-9.

Melnick JL. Enterovirus type 71 infections: a varied clinical pattern sometimes mimicking paralytic poliomyelitis. *Rev infect Dis* 1984; 6 (Supple 2): S 387 – 390.

Melnick JL. Enterovirus: poliovirus, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In Knipe DM, Howley PM (eds), *Fields Virology*. 3<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers, 1996. p. 655 – 712.

Melnick, JL. Enteroviruses: polioviruses, coxsackie viruses, echoviruses and the newer enteroviruses. In: Fields, B.N., (Ed.), *Virology*: New York, Raven Press, 1985. p. 739-794.

Mhalu FS, Myrmel H, Msengi A, Haukenes G. Prevalence of infection with rotavirus and enteric adenoviruses among children in Tanzania. *NIPH Ann* 1988; 11:3-7.

Minor PD, Ferguson M, Katrak K, Wood D, John A, Howlett J, et al., Antigenic chimeras of type 1 and type 3 poliovirus involving antigenic site 1. *Journal of General Virology* 1990; 71, 2543-2551.

Minor PD, Muir P. Enteroviruses. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD, Schoub BD, editores. *Principles and practice of clinical virology*. Chichester: Wiley, 2009. p. 467–490.

Minor PD. Antigenic structure of picornavirus. *Curr Top immunol Microbiol*. 1990; 161:121-154.

MISAU. Política nacional de saúde neonatal e infantil em Moçambique. Direcção Nacional de Saúde. Departamento de Saúde da Comunidade. Secção de Saúde Infantil. Maputo, Dezembro de 2006.

MISAU. Retroinformação sobre a vigilância das PFA em Moçambique, Janeiro a Dezembro de 2011. Direcção Nacional de Saúde Pública. Maputo, Janeiro de 2012.p. 1-6.

Modlin, JF. Coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Mandell GL, Bennet JE & Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4<sup>th</sup> ed. New York: Churchill Livingstone; 1995. p. 1620–1632.

Moore M, Kaplan MH, McPhee J, Bregman DT, Klein SW. Epidemiologic, clinical, and laboratory features of Coxsackievirus B1-B5 infections in the United States, 1970-79. *Public Health Rep* 1984; 99 (5): 515-22.

Moore M, Kaplan MH, McPhee J, et al.,. Epidemiologic, clinical, and laboratory features of Coxsackie B1–B5 infections in the United States, 1970–79. *Public Health Rep* 1984; 99:515–522.

Moore M, Morens DM. Enteroviruses, including Polioviruses. In: Belshe RB. *Textbook of Human Virology*, USA PSG: Publishing; 1984. p. 403 – 483.

Moore P, Steele AD, Lecatsas G, Alexander JJ. Characterization of gastroenteritis-associated adenoviruses in South Africa. *S Afr Med J* 1998; 88:1587-1592.

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

MS. Guia de Vigilância Epidemiológica. Caderno 4. Poliomielite. Secretaria de Vigilância em Saúde /MS. 2009.

Murray KE; Barton DJ. Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol* 2003; Apr Vol. 77, No. 8; p. 4739–4750.

Nimzing L, Geyer A, Sebata T, et al. Epidemiology of adenoviruses and rotaviruses identified in young children in Jos, Nigeria. *S Afr J Epidemiol Infect* 2000. 15: 40-42.

Norder H, Bjerregaard L, Magnius LO, Lina B, Aymard M, Chomel JJ. Sequencing of “untypable” Enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human Enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *J Gen Virol* 2003; 84: 827-36.

Notícias J 2011. Imigração ilegal ganha forma mais complexas. Ed. 21 de Março de 2011. Moçambique

Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of ‘untypeable’ enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1170 - 4.

Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human Enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (5): 1288-93.

Oberste MS, Maher K, Michele SM, Belliot G, Uddin M, Pallansch MA. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human Enterovirus A. *J Gen Virol* 2005; 86 (2): 445-51.

Oberste MS, Michele SM, Maher K, Schnurr D, Cisterna D, Junttila N, et al.,. Molecular identification and characterization of two proposed new Enterovirus serotypes, EV73 and EV 74. *J Gen Virol* 2004; 85 (11): 3205 -12.

Oberste MS, Nix NA, Maher K, Pallansch MA. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol* 2003; 26: 375–7.

Oberste MS, Nix WA, Kilpatrick DR, Flemister MR, Pallansch MA. Molecular epidemiology and type-specific detection of echovirus 11 isolates from the Americas, Europe, Africa, Australia, southern Asia and the Middle East. *J Virus Res* 2003; 91 (2), 241-248.

Oberste MS, Maher K, Williams AJ, Dybdahl-Sissoko N, Brown BA, Gookin MS, et al. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol* 2006; 87 (PT 1), 119-128.

Organização Mundial de Saúde. Polio laboratory case definition. Australian Government. [[http://www.Health.gov.au/internet/wcms/Publishing.nsf/Content/cda-phlncdpoio.htm/\\$FILE/polio.pdf](http://www.Health.gov.au/internet/wcms/Publishing.nsf/Content/cda-phlncdpoio.htm/$FILE/polio.pdf)]. 2000.

Organização Mundial de Saúde. Polio laboratory manual, 4th edition. World Health Organization, Geneva, Switzerland. pp: 87-121. 2004.

Oxman M. Enterovirus. In: OXMAN, M. Tratado de Medicina Interna, vol.1. 20<sup>th</sup> Ed. Bennett & Plum; 1999. p. 1968-78.

Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B & Straus SE. Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins; 2001. v2: 723-767.

Pavlov DN, Van Zyl WB, Van Heerden J, Kruger M, Blignaut L, Grabow WO, et al. Poliovirus vaccine strains detected in stool specimens of immunodeficient children in South Africa. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54:23-30.

Portaldogoverno homepage: [www.portaldogoverno.gov.mz/noticias](http://www.portaldogoverno.gov.mz/noticias). Imigração ilegal: PRM investiga alegados esquemas de corrupção. Maputo, 2011; 01 Mar. (AIM).

Racaniello VR. Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. Fields Virology, 4 ed. Philadelphia: Lippincott - Williams & Wilkins; 2001. v2: 685-722.

Racaniello VR. Poliovirus neurovirulence. *Adv Virus Res* 1988; 34: 217-46.

Rakoto-Andrianarivelo M, Guillot S, Iber J, Balanant J, Blondel B, Riquet F, et al. Co-circulation and evolution of polioviruses and species C enteroviruses in a district of Madagascar. *J PLoS Pathog* 2007; 3 (12), E191.

Rao DC, Subbanna SK. Enteroviruses associated with non-polio acute flaccid paralysis in children in India. Unpublished Submitted (05-JUL-2011) Department of Microbiology & Cell Biology. 2012.

Rezapkin GV, Fan L, Asher DM, Fibi MR, Dragunsky EM, Chumakov KM. Mutations in Sabin 2 strain of poliovirus and stability of attenuation phenotype. *J Virology* 2002; 258 (1), 152-160.

Roh EJ, Jin YM, Chung EH, Chang YP, Park WS, Park K, et al. Molecular identification and clinical features of enteroviral infection in children of central Korea: An overview of enteroviral epidemiology between spring 2005 and autumn 2006. *Korean Journal of Pediatrics* 2009; Vol. 52, No. 11.

Romero JR. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123:1161–1169.

Rotbart H. Meningitis and encephalitis. In: Rotbart H, ed. *Human Enterovirus Infections*. Washington, DC: ASM Press; 1995; 271–289.

Rotbart HA, Brennan PJ, Fife KH, Romero JR, Griffin JA, McKinlay MA, et al. Enterovirus meningitis in adults. *Clin Infect Dis* 1998; 27:896–898.

Rueckert RR. Picornaviridae: The virus and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. *Fields Virology*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers; 1996. p. 2231-95.

Saeed M, Zaidi SZ, Naeem A, Masroor M, Sharif S, Shaukat S, et al. Epidemiology and clinical findings associated with enteroviral acute flaccid paralysis in Pakistan. *BMC Infectious Diseases* 2007; 7:6.

Santos AP, Costa EV, Oliveira SS, Souza MC, da Silva EE. RT-PCR based analysis of cell culture negative stools samples from poliomyelitis suspected cases. *J Clin Virol* 2002; 23: 149 – 152.

Santos GPL. Estudo da frequência de enterovírus associados a surtos e casos esporádicos de meningite viral ocorridos no Brasil, no período de dezembro de 1998 a dezembro de 2003, e análise do perfil dos pacientes. Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz. 2005.

Santos NSO, Benati FJ. Diagnóstico laboratorial das viroses. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Introdução à Virologia Humana*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan; 2008. p. 371-387.

Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18: 1033-39.

Simonen-Tikka ML, Pflueger M, Klemola P, Savolainen-Kopra C, Smura T, Hummel S, et al. Human enterovirus infections in children at increased risk for type 1 diabetes: the Babydiet study. *J Diabetologia* 2011; 54 (12), 2995-3002.

Steele AD, Basetse HR, Blacklow NR, Herrmann JE. Astrovirus infection in South Africa: a pilot study. *Ann Trop Paediatr* 1998; 18: 315 - 319.

Strikas RA, Anderson LJ, Parker RA. Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enterovirus in the United States, 1970–1983. *J Infect Dis* 1986; 153:346 – 351.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007; 24:1596-1599.

The Picornaviridae Homepage. Disponível no endereço electrónico: <http://www.picornaviridae.com> (Acesso 19:05 minutos, data de acesso 31/08/12).

Verheyen J, Timmen-Wego M, Laudien R, Boussaad I, Sen S, Koc A, et al. Detection of Adenoviruses and Rotaviruses in Drinking Water Sources Used In Rural Areas of Benin, West Africa. *Journal Of Clinical Microbiology* 2009; Vol. 75, No. 9.

Wadell G, Allard A, Hierholzer JC. Adenoviruses. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover F, Tenover F, Tenover F, Yolken RN (editors). *Manual of Clinical Microbiology*. 7<sup>th</sup>ed . Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. p. 970-982.

Wadell, G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr Trop Microbiol Immunol* 1984; 110:191 - 220.

White DO, Fenner FJ. Structure and composition of viruses. In: White DO, Fenner FS, editores. *Medical Virology*. 4. ed. California: Academic Press, 1994. p. 3 – 6.

Wildy P. Classification and nomenclature of viruses. First report of the International Committee on Nomenclature of Viruses. *Monogr Virol* 1971; 5:1 – 65.

Wimmer E, Hellen CUT, Cao X. Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet* 1993; 27: 353 – 436.

Witsø E, Palacios G, Cinek O, Stene LC, Grinde B, Janowitz D, et al. High Prevalence of Human Enterovirus A Infections in Natural Circulation of Human Enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (11): 4095. DOI: 10.1128. 00653 - 06.

Xu W, Mcdonough MC, Erdman DD. Species-specific identification of Human adenoviruses by multiplex PCR Assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4114-20.

Yamazaki K, Oishi I, Minekawa Y. Nucleotide sequence analysis of recent epidemic strains of enterovirus 70. *Microbiol Immunol* 1995; 39: 429 – 432.

## **ANEXOS**

# ANEXO 1



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

## MINISTÉRIO DA SAÚDE

### COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE IRB00002657

Exmo Senhor  
Dr. Diocreciano Matias Bero  
INS

Ref: 280/CNBS/11

Data 29 de Setembro de 2011

**Assunto:** *aprovação do protocolo "Pesquisa de Enterovirus humanos em crianças menores de 15 anos de idade, no Hospital Geral de Mavalane."*

O Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou as correcções efectuadas no protocolo intitulado: "***Pesquisa de Enterovirus humanos em crianças menores de 15 anos de idade, no Hospital Geral de Mavalane.***" 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 os investigadores que o mantenham informado do decurso do estudo.

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

Sem mais de momento as nossas cordiais saudações.

O Vice-Presidente



Dr. João Schwalbach

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

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

## ANEXO 2

### **"Identificação de Enterovírus humanos a partir de amostras fecais de crianças menores de 15 anos, atendidas no Hospital Geral de Mavalane na Cidade de Maputo, Moçambique"**

É importante ler a informação contida neste documento. Nele explicamos o propósito do estudo, como será realizado e as implicações a sua criança. Antes de tomar a decisão sinta-se livre de perguntar sobre qualquer dúvida que tiver. Nós vamos explicar de novo. Se aceitar vamos pedir que assine este documento e uma das cópias ficará consigo.

#### **Informação de base**

Os Enterovírus humanos, infectam muitas pessoas no mundo por ano, causando um grande número de doenças que vão desde infecção sem manifestação da doença, febres, gripe, doença de mãos-pés e boca, diarreia, pneumonia, conjuntivite, poliomielite.

As crianças adoecem facilmente do que adultos. A pessoa pode ter a doença comendo alimentos ou tomando água contaminada por esses vírus.

Estes vírus circulam durante todo o ano em climas tropicais como é caso do nosso país; causando doenças de curta duração e graves, afectam muitas pessoas e provocam prejuízos porque as pessoas não conseguem ir trabalhar, ou tem de cuidar seus filhos doentes.

Através da sua participação, se for possível mostrar quais os vírus circulam na comunidade e que estão causando doenças graves, então as autoridades nacionais de saúde serão informadas e terão de procurar soluções para prevenir estas doenças, reduzindo deste modo o número de pessoas que ficam doentes.

Este estudo é uma parceria do Instituto Nacional de Saúde de Moçambique e da Fundação Oswaldo Cruz. O estudo é financiado pelo Ministério da Saúde de Moçambique e Laboratório de Enterovírus da Fundação Oswaldo Cruz do Brasil.

#### **Escolha dos participantes:**

Para fazer parte do estudo terá de obedecer os seguintes requisitos:

- Ser menor de 15 anos de idade,
- Ser atendido no Hospital Geral de Mavalane,
- Ter pelo menos 4 ou mais sinais ou sintomas, compatível a uma doença causada por Enterovírus,
- Aceitar em participar no estudo como voluntário,
- O estudo terá a duração de 4 meses, de novembro de 2011 à fevereiro 2012.

#### **Procedimentos do estudo:**

- Se aceitar em participar, primeiro será feito algumas perguntas sobre a sua saúde, depois será levada uma e única amostra de fezes em um frasco próprio, que será dado se aceitar participar.
- Está amostra depois será analisada no laboratório para ver se apresenta estes os vírus ou não.

### **Vantagens em participar no estudo:**

- a) Com a sua participação no estudo não terá benefícios diretos, contudo este estudo poderá fornecer dados sobre aos principais vírus que circulam em crianças na comunidade, e permitirá que se recomenda ao Ministério da Saúde de Moçambique a desenhar medidas de prevenção destes vírus, de modo controlar estas doenças na comunidade e desta forma melhorar a qualidade de vida das pessoas.
- b) A vacina contra o vírus da Pólio será recomendado a pacientes menores de 5 anos de idade que ainda não foram vacinados, beneficiando da vacina anti-pólio administradas pelo pessoal do Programa Alargado de Vacinação.
- c) Se for detectado vírus da Pólio selvagem ou derivado da vacina capaz de induzir a paralisia, o Ministério da Saúde será recomendado para fortalecer o programa de vacinação na cidade de Maputo de modo a acabar com a circulação do vírus na comunidade.

### **Riscos relacionados à sua participação**

- d) A participação no estudo não lhe trará a nenhum risco, a sua saúde, pois não haverá intervenção directa sobre o paciente.

### **Seus direitos durante o estudo e confidencialidade**

- e) Os registos da sua participação serão usados apenas para efeitos deste estudo.
- f) O seu nome será usado apenas na folha de recolha de dados do estudo e rótulo do frasco com a amostra (fezes).
- g) Apenas membros do estudo, do comité de ética e a pessoa encarregada do estudo em nome do patrocinador terão acesso a informação ligando o seu nome com o seu número do estudo. Os dados recolhidos serão tornados anónimos.
- h) Poderá ter acesso à sua informação em qualquer altura e o seu direito a rectificá-la ou opor-se a ela é garantido durante o estudo. Este direito pode ser exercido mediante o intermediário do coordenador local do estudo, cujo nome é indicado abaixo.
- i) A sua participação neste estudo é completamente voluntária, e não lhe custará nada. O seu filho apenas participará neste estudo se você concordar. O seu filho poderá abandonar o estudo a qualquer altura. Isso não afectará os cuidados de saúde que ele/ela ou família recebem.

### **Quem pode contactar em caso de problemas?**

Pode contactar qualquer pessoal do estudo se tiver problemas ou perguntas:

**Diocreciano Matias Bero**, coordenador do estudo (tel: +258 82 54 77 380)

Email: [dmbero@gmail.com](mailto:dmbero@gmail.com)

**Ussene Isse**, Clínico responsável pela operacionalização do estudo,

Email: [ussene.isse@gmail.com](mailto:ussene.isse@gmail.com)

Obrigado pelo tempo que disponibilizou para ler este formulário e por considerar a possibilidade de ajudar neste estudo. Para participar neste estudo, é necessário que o(s) pai(s) ou encarregado(s) de educação da criança assine (m) o formulário de consentimento.

**Declaração do participante:**

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

-----  
Data e hora: Nome do paciente

-----  
Data e hora: Nome do acompanhante

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

**Declaração do coordenador do estudo:**

Eu, abaixo-assinado, expliquei ao voluntário numa linguagem que ele compreende os procedimentos do estudo, os seus objectivos, o risco e benefícios associados com a sua participação. Informei o voluntário que o anonimato será mantido e que este é livre de se retirar do estudo em qualquer altura sem que isto afecte os cuidados que recebe na clínica. Seguindo a minha explicação o voluntário concorda participar no estudo.

-----  
Data e hora Nome do coordenador do estudo

-----  
Assinatura

### ANEXO 3

**Título do estudo:** Identificação de Enterovírus humanos a partir de amostras fecais de crianças menores de 15 anos, atendidas no Hospital Geral de Mavalane na Cidade de Maputo, Moçambique

#### Folha de recolha de dados

Nº no estudo: \_\_\_\_\_ NID: \_\_\_\_\_ Data da coleta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_:\_\_\_\_\_

#### INFORMAÇÕES DO PACIENTE:

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

P1. 1. Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo: 2.  M 3.  F 4.  Ignorado

P2. Endereço: 1. (Bairro/Provincia): \_\_\_\_\_  
Zona: 2.  Urbana 3.  Periurbana 4.  Rural 5.  Não sabe

P3. Tipo de alimentação: 1.  Somente leite materno 2.  Mista 3.  Diversificada

#### INFORMAÇÕES CLÍNICAS DO PACIENTE:

P4. Atendimento: 1.  Interno 2.  Ambulatorial

P5. Vacina anti-polio: 1.  Uma dose 2.  Duas doses 3.  Três doses 4.  Não vacinado  
5.  Não sabe se tomou a vacina 6. Data de ultima dose: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

P6. 1. Data de internação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 2. Data de início dos sintomas: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

P7. Presença de:

- |  |   |   |   |
|--|---|---|---|
| 1. <input type="checkbox"/> Febre        | 5. <input type="checkbox"/> Dor de cabeça   | 9. <input type="checkbox"/> Vômitos/Naúsea      | 13. <input type="checkbox"/> Dores musculares         |
| 2. <input type="checkbox"/> Prostração   | 6. <input type="checkbox"/> Resfriado comum | 10. <input type="checkbox"/> Dor da garganta    | 14. <input type="checkbox"/> Deficiência motora       |
| 3. <input type="checkbox"/> Conjuntivite | 7. <input type="checkbox"/> Diarréia        | 11. <input type="checkbox"/> Pequenas vesículas | 15. <input type="checkbox"/> Dificuldade respiratória |
| 4. <input type="checkbox"/> Exantema     | 8. <input type="checkbox"/> Rigidez da nuca | 12. <input type="checkbox"/> Obstipação         | 16. <input type="checkbox"/> Outros sintomas          |

P8. Condições associadas: 1.  SIDA/HIV 2.  Outros/Quais: \_\_\_\_\_

#### PACIENTE INTERNADO:

P9. Motivo da internação: 1.  Desnutrição 2.  Outro/Qual: \_\_\_\_\_

P10. Setor de internação: 1.  Pediatria 2.  Outro

P11. Peso (g) \_\_\_\_\_ Altura (cm) \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

#### SITUAÇÃO SOCIOECONÔMICA DA FAMÍLIA

P12. Casa com água canalizada: 1.  Sim 2.  Não

P13. Quantas pessoas dormem no mesmo quarto: 1.  Até duas 2.  Até 4 3.  Mais de 4

#### O CLÍNICO/PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Nome: \_\_\_\_\_ Rubrica: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## ANEXO 4

### Iniciadores utilizados na reações de RT-PCR, sequenciamento e PCR.

Iniciadores	Orientação	Sequências (5' → 3') <sup>a</sup>	Tamanho do Amplicom (pb)	Posição
EVF	Senso	CTC CGG CCC CTG AAT GCG GCT A	153 pb	445-466
EVR	Reverso	ATT GTC ACC ATA AGC AGC C	153 pb	599-581
PAN PVR	Reverso	TTT AII GCR TGI CCR TTR TT	79 pb	2934-2915
PAN PVF	Senso	CIT AIT CIM GIT TYG AYA TG	79 pb	2857 -2876
Y7	Senso	GGG TTT GTG TCA GCC TGT AAT GA	1100 pb	2402-2422
Q8	Reverso	ACY AAG AGG TCT CTA TTC CAC	1100 pb	3507-3487
292	Senso	MIG CIG YIG ARA CNG G	357 pb	2612-2627
222	Reverso	CIC CIG GIG GIA YRW ACA T	357 pb	2969-2951
AD (1)	Senso	GCC GAC AAG GGC GTC CGC AGG TA	134 pb	1834-1853
AD (4)	Reverso	ATG ACT TTT GAG GTG GAT CCC ATG GA	134 pb	2315-2296

a - R= A/G; M=A/C; W=A/T; I=A/C/G/T; K=G/T; Y=C/T (Código IUPAC de bases degeneradas)

