

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
MESTRADO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA

GABRIEL AZEVEDO ALVES LEITÃO

**DETECÇÃO DE ADENOVIRUS, BOCAVIRUS E SAPOVIRUS EM CRIANÇAS DA  
REGIÃO AMAZÔNICA APRESENTANDO DOENÇA DIARREICA AGUDA OU  
INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA**

Rio de Janeiro

2020

Gabriel Azevedo Alves Leitão

DETECÇÃO DE ADENOVIRUS, BOCAVIRUS E SAPOVIRUS EM CRIANÇAS DA  
REGIÃO AMAZÔNICA APRESENTANDO DOENÇA DIARREICA AGUDA OU  
INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Isabella Fernandes Delgado.  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Marcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza.

Rio de Janeiro

2020

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Leitão, Gabriel Azevedo Alves

Detecção de Adenovirus, Bocavirus e Sapovirus em crianças da região amazônica apresentando doença diarreica aguda ou infecção respiratória aguda. / Gabriel Azevedo Alves Leitão. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.

74 f. : fig. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

Orientadora: Isabella Fernandes Delgado.

Co-orientadora: Marcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza.

1. Disenteria. 2. Infecções Respiratórias. 3. Roraima. 4. Monitoramento Epidemiológico. 5. Vacinas contra Rotavirus. I. Título.

Detecção de Adenovirus, Bocavirus e Sapovirus em crianças da região amazônica apresentando doença diarreica aguda ou infecção respiratória aguda.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - FinanceCode 001."

GABRIEL AZEVEDO ALVES LEITÃO

DETECÇÃO DE ADENOVIRUS, BOCAVIRUS E SAPOVIRUS EM CRIANÇAS  
DA REGIÃO AMAZÔNICA APRESENTANDO DOENÇA DIARREICA AGUDA OU  
INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em 28 de maio de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Paulo Emílio Corrêa Leite (Doutor)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Luciane Almeida Amado Leon (Doutora)  
Instituto Oswaldo Cruz

ORIENTADOR (ES)

Isabella Fernandes Delgado (Doutora) - orientadora  
Vice-presidência de Educação, Informação e Comunicação / FIOCRUZ

Marcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza (Doutora) - co-orientadora  
Instituto Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho a minha  
avó Maria Penha e a minha mãe Giane

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder saúde e discernimento no decorrer da realização deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento de minha bolsa de mestrado e ao PrInt Fiocruz – CAPES pelo financiamento da publicação do artigo gerado por este trabalho.

A minha mãe, meu pai, minha avó e familiares pelo apoio durante o decorrer do mestrado.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Marcia Terezinha por todos os ensinamentos passados desde minha iniciação científica até aqui, pela confiança para a realização deste projeto, por todo o companheirismo, paciência, incentivo, suporte e pela felicidade em ensinar e fazer ciência, sendo a maior responsável pelo andamento deste trabalho.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Isabella Delgado por ter aceitado participar deste projeto e ter a mim como aluno, mesmo sendo um campo de conhecimento diferente do seu habitual, por toda sua dedicação a este trabalho, todo conhecimento passado e ajuda prestada durante a toda a realização do meu mestrado.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde (INCQS) pela oportunidade da realização deste mestrado e pelo fornecimento de sua infraestrutura, agradeço também a todo o corpo docente e funcionários da pós-graduação por todo conhecimento passado e auxílio prestado durante o curso.

Ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental pelo fornecimento de toda a infraestrutura, insumos e equipamentos necessários, assim como agradeço a todos os pesquisadores, técnicos, alunos, funcionários e colaboradores do laboratório pelas dúvidas tiradas, ajudas prestadas, conhecimentos passados e momentos de descontração. Agradeço também ao pediatra e participante do projeto Alberto Olivares, responsável pela coleta das amostras utilizadas no estudo.

Às amigas, Débora, Talita e Rosângela que fiz durante o decorrer do curso por todo apoio e a ajuda durante as disciplinas, pelo companheirismo, momentos de descontração, conhecimentos trocados e incentivos durante a escrita deste trabalho, motivos pelos quais agradeço também aos demais colegas de turma.

Aos membros titulares da banca Dr. Ivano de Filippis, Dr. Paulo Emílio e Dr<sup>a</sup>. Luciana Amado, assim como aos membros suplentes Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Martins de

Almeida Nogueira e Dr. José Mauro Granjeiro por aceitarem participar da avaliação deste projeto e por todo conhecimento, sugestões e direcionamentos fornecidos no início e agora no final.

Aos meus grandes amigos Mateus, Jessika, Andressa, Marcos, Dione e Magda pelo incentivo durante o mestrado, contribuindo mesmo que de forma indireta.

À Fundação Oswaldo Cruz por seu papel indispensável na ciência e saúde pública da sociedade brasileira.

“Esvazie sua xícara primeiro, só então você poderá provar meu chá. Afinal de contas a utilidade da xícara está em poder esvaziar-se. Abra sua mente para receber novas ideias.”

Bruce Lee

## RESUMO

A doença diarréica aguda (DDA) ou gastroenterite aguda (GA) é uma síndrome causada por diferentes agentes etiológicos (vírus, bactérias e parasitas), cuja manifestação predominante é o aumento do número de evacuações, com fezes aquosas, podendo trazer sintomas mais graves dependendo do quadro infeccioso. A DDA é a principal causa de mortalidade entre crianças menores de cinco anos de idade, devido ao grave quadro de desidratação causado, algo que se agrava em regiões que carecem de saneamento básico e assistência médica. Os Rotavírus do grupo A (RVA) são importantes responsáveis por um terço dos casos de DDA em neonatos e lactantes. Por isso em 2006, a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) declararam como prioridade nas Américas a vacinação contra o RVA nos Programas Nacionais de Imunização (PNI), com a meta de prevenir mortes e hospitalizações causadas por este agente viral causador de mortalidade e morbidade nas Américas. No Brasil foi introduzida a vacina monovalente Rotarix<sup>®</sup> (Vacina Oral Rotavírus Humano: VORH, chamada de RV1), e apesar das hospitalizações e mortalidade infantil terem sido significativamente reduzidas após sua inserção, casos de DDA continuam ocorrendo mesmo em crianças vacinadas, algo que pode estar relacionado à recombinação genética do RVA, a susceptibilidade do hospedeiro à infecção ou a um vírus gastroentérico emergente estar assumindo o lugar do RVA como grande causador de DDA. Dentro deste panorama, este trabalho é parte de um projeto maior que tem como objetivo principal identificar os vírus causadores de DDA, em uma coorte de crianças de 0 a 5 anos atendidas no Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA) do estado de Roraima, em Boa Vista, buscando identificar se há a ascensão de outro vírus causador de DDA e evidenciar o funcionamento do PNI numa região com diversos locais indígenas de difícil acesso e grande fluxo de imigrantes. Neste projeto maior foram incluídas amostras de crianças com quadro de infecção respiratória aguda (IRA), da mesma faixa etária, como um grupo controle. Além disso, os resultados de detecção de RVA e norovírus, assim como o perfil de RV1 vacinal das crianças foram considerados. Essa dissertação apresenta os resultados da pesquisa dos Adenovírus (HAdV) e Bocavírus (HBoV) humanos, ambos causadores tanto de DDA como de IRA e do Sapovírus humano (SaV), este último considerado vírus emergente causador somente de DDA. Um método de *quantitative*

*polymerase chain reaction* (qPCR) duplex foi padronizado para a detecção simultânea de HAdV e HBoV em amostras de fezes e saliva, e a frequência destes vírus foi determinada. Para ambos os grupos de crianças com DDA e IRA a frequência detectada foi similar, no entanto maior para HAdV (DDA 33,6%; IRA 39,8%) do que para HBoV (DDA 14,2%; IRA 14,1%). A genotipagem das amostras de HAdV e HBoV positivas apresentou uma grande diversidade de genótipos para HAdV, como HAdV53 e HAdV56 entre outros em amostras de crianças tanto com DDA como IRA. Uma alta frequência de HBoV1 em amostras de crianças com DDA foi detectada e ao contrário, HBoV2 foi mais frequente em amostras de crianças com IRA. Os genótipos identificados tanto de HAdV como HBoV foram detectados tanto em fezes quanto em saliva, e a presença de RNA mensageiro de HBoV1 em três amostras de crianças com DDA evidenciou este genótipo como um causador de DDA neste grupo de crianças. O SaV humano foi detectado em fezes de crianças com DDA e IRA por meio de *reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction* (RT-qPCR) a uma frequência similar nos dois grupos, porém menor (DDA 7,2%; IRA 6,8%), em comparação aos HAdV e HBoV, indicando que estes vírus podem estar circulando no grupo de crianças estudado, mesmo sem causar DDA.

Palavras-chave: Doença Diarréica Aguda. Infecção Respiratória Aguda. Roraima. Controle Epidemiológico. Vacina Rotavirus A.

## **ABSTRACT**

Acute diarrheal disease (ADD) or acute gastroenteritis (AG) is a disease caused by different etiologic agents (viruses, bacteria and parasites), whose manifestation is predominant or increases the number of bowel movements, with watery stools, offering more serious risks. ADD is the main cause of mortality among children under five years of age, due to the severe condition of dehydration caused, something that worsens in regions that need basic sanitation and medical assistance. Group A rotaviruses (RVA) are important co-responsible for one of the cases of ADD in neonates and nursing mothers. Calculated in 2006, the Pan American Health Organization (PAHO) and the World Health Organization (WHO) declared vaccination against RVA in the National Immunization Programs (NIP) a priority in the Americas, with a goal of preventing deaths and hospitalizations caused by this viral agent that causes mortality and morbidity in the Americas. In Brazil, the Rotarix® monovalent vaccine (Oral Human Rotavirus Vaccine: OHRV, called RV1) was introduced, and although hospitalizations and infant mortality have been significantly reduced after insertion, ADD cases continue to occur even in vaccinated children, something that can be related to the genetic recombination of RVA, the susceptibility of the host to infection or to an emerging gastroenteric virus to be taking the place of RVA as a major cause of ADD, in addition, some regions such as the north of the country do not suffer difficulties in attending by NIP, due to difficult access and lack of necessary resources. Within this panorama, this work is part of a larger project whose main objective is to identify the viruses that cause ADD, in a cohort of children aged 0 to 5 years attended at the Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA) in the state of Roraima, in Boa Vista, seeking to identify if there is the rise of another virus that causes ADD and to show the functioning of the PNI in a region with several indigenous places of difficult access and a large flow of immigrants. This study also included samples of children with acute respiratory infection (ARI), of the same age group, as a control group. In addition, the results of detection of RVA and norovirus, as well as the vaccine RV1 profile of children were considered. This dissertation presents the results of the research of the human Adenovirus (HAdV) and Bocavirus (HBoV), both of which cause both ADD and ARI and human Sapovirus (SaV), the

latter considered an emerging virus that causes ADD. A duplex quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method was standardized for the simultaneous detection of HAdV and HBoV in stool and saliva samples, and the frequency of these viruses was determined. For both groups of children with ADD and ARI the detected frequency was similar, however higher for HAdV (ADD 33.6%; ARI 39.8%) than for HBoV (ADD 14.2%; ARI 14.1%). The genotyping of positive HAdV and HBoV samples showed a great diversity of genotypes for HAdV, such as HAdV53 and HAdV56 among others in samples from children with both ADD and ARI. A high frequency of HBoV1 in samples from children with ADD was detected and, conversely, HBoV2 was more frequent in samples from children with ARI. The identified genotypes of both HAdV and HBoV were detected in both feces and saliva and the presence of messenger RNA HBoV1 in three samples of children with ADD showed this genotype as a cause of ADD in this group of children. Human SaV were detected in the feces of children with ADD and ARI by reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) at a similar frequency in these two groups, but lower (ADD 7.2%; ARI 6.8%), indicating that these viruses they may be circulating in the group of children studied, even if they do not cause ADD.

Keywords: Acute Diarrheal Disease. Acute Respiratory Infection. Roraima. Epidemiological Control. Rotavirus A vaccine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Perfil de mortalidade causado por doença diarréica aguda segundo a distribuição mundial.....	18
Figura 2 - Mapa apresentando os estados do Brasil e países que compõem a Amazônia. ....	19
Figura 3 - Casos de DDA notificados durante o período de 2007 a 2017, registrados pelo sistema de vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde .....	21
Figura 4 - Informações gerais sobre RR.....	22
Figura 5 - Terras indígenas demarcadas no estado de RR.....	23
Figura 6 - Distribuição das notificações de DDA em RR por faixa etária entre 2014 e 2017. ....	24
Figura 7 - Número de notificações de DDA e casos confirmados positivos de rotavírus A no período de 2014 a 2017. ....	25
Figura 8 - Estrutura e proteínas do rotavírus. A esquerda a representação de um gel de poliacrilamida apresentando a localização dos 11 segmentos genômicos virais e as proteínas codificadas por cada segmento, enquanto a direita ilustrações da estrutura do RV. ....	26
Figura 9 - Resultados da cobertura vacinal da RV1 no período de 2016 a 2017 para os 15 municípios do estado de Roraima. ....	30
Figura 10 - Resultados da cobertura vacinal da VORH entre os anos de 2015 e 2018 para as regiões do Brasil.....	30
Figura 11 - Número de internações por diarreia associadas ao rotavírus A em crianças menores de 5 anos no Brasil, no período de 2006 a 2014 (pós-vacinal). ....	31
Figura 12 - Análise comparativa das proteínas geradas pelas sequências nucleotídicas das amostras HAdV positivo e as sequências de referência, comparando grupo doença diarréica aguda (A), infecção respiratória aguda (B) e a relação evolutiva das amostras HAdV53.....	59
Figura 13 - Árvore filogenética demonstrando a proximidade evolutiva entre as amostras caracterizadas e as amostras referência. ....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Crianças vacinadas com os RVA atendidas no HCSA. 0 = nenhuma dose vacinal, 1 = uma dose vacinal e 2 = duas doses vacinais. Amostra = crianças com DDA e Controle = crianças sem DDA.....	36
Tabela 2 - Relação de amostras de fezes e saliva recebidas por mês enviadas pela UFRR no período de outubro de 2016 a outubro de 2017. ....	41
Tabela 3 - Relação de insumos para detecção de HAdV e HBoV por qPCR multiplex (A) e detecção de SaV por qPCR simplex (B).....	41
Tabela 4 - Frequência de Adenovirus (HAdV), Bocavirus (HBoV) e Sapovirus (SaV) detectados nos dois diferentes grupos de crianças analisados, divididos em grupo com doença diarreica aguda (DDA) e infecção respiratória aguda (IRA).....	51
Tabela 5 - Frequência de Adenovirus (A), Bocavirus (B) e Sapovirus (C) detectados nos grupos de doença diarreica aguda (DDA) e infecção respiratória aguda (IRA) em amostras sem e com a presença de outro vírus simultaneamente. ....	51
Tabela 6 - Positividade para Adenovirus (HAdV), Bocavirus (HBoV) e Sapovirus (SaV) humanos dentro dos grupos de crianças vacinadas e não vacinadas com RV1 nos grupos de amostras de doença diarreica aguda (DDA) e infecção respiratória aguda (IRA).....	50
Tabela 7 - Amostras positivas para Adenovirus humano e Bocavirus humano selecionadas. As amostras taxadas de cinza e grifadas foram amplificadas na PCR quantitativa.....	51
Tabela 8 - Genótipos detectados nas amostras sequenciadas (A), amostras sequenciadas contendo coinfeção para outros vírus (B), amostras de fezes e saliva sequenciadas pertencentes a mesma criança (C) e divisão das amostras sequenciadas por seus respectivos grupos.....	53
Tabela 9 - Genótipos de bocavirus humano detectados nas amostras de fezes e saliva sequenciadas, demonstrando também a ocorrência de coinfeção para os grupos de doença diarreica aguda (A) e infecção respiratória aguda (B).....	61
Tabela 10 - Amostras HBoV1 do grupo DDA amplificadas no teste para detecção de RNA mensageiro.....	61

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AdV	Adenovirus
AIPC	Assentimento Informado para Pesquisa em Crianças
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BoV	Bocavirus
$C_t$	<i>Cycle treshold</i>
DDA	Doença Diarréica Aguda
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FUNAI	Fundação Nacional do Índio
G	Genogrupo
GG	Genótipo
HAdV	Adenovirus humano
HBoV	Bocavirus humano
HCSA	Hospital da Criança Santo Antônio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
IC	Intervalo de confiança
IRA	Infecção Respiratória aguda
LVCA	Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental
MDDA	Monitorização das DDA
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NSPs	<i>Non-structural proteins</i>
NTC	<i>Non-template controls</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIB	Produto Interno Bruto
PNI	Programa Nacional de imunização
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>

RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RR	Roraima
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RV	Rotavirus
RVA	Rotavirus do grupo A
SE	Semana Epidemiológica
Sivep-DDA	Sistema informatizado de vigilância das DDA
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UFRR	Universidade Federal de Roraima
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para Infância
VORH	Vacina Oral Rotavirus Humano
VPs	<i>Viral proteins</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 Doença diarréica aguda .....	17
1.2 Panorama da DDA no Brasil e no estado de Roraima .....	18
1.3 Rotavírus .....	25
1.4 Vacinação .....	28
1.5 Outros vírus causadores de DDA .....	31
1.5.1 Norovírus .....	32
1.5.2 Adenovírus .....	32
1.5.3 Bocavírus .....	33
1.5.4 Sapovírus .....	34
<b>2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b> .....	<b>36</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	Error! Bookmark n
3.1 Objetivo geral .....	39
3.2 Objetivos específicos .....	39
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>40</b>
4.2 Desenho do estudo, população de estudo (coorte) e tamanho da amostra .....	40
4.3 Avaliação clínico-epidemiológica dos casos de DDA .....	41
4.4 Localização das amostras .....	40
4.5 Processamento das amostras .....	40
4.6 Detecção dos vírus .....	40
4.7 Amplificação das amostras de saliva e seleção de amostras de fezes e saliva positivas para o sequenciamento .....	43
4.8 Sequenciamento das amostras positivas .....	46
4.9 Análise das sequências e definição dos genótipos .....	47
4.10 Detecção do RNA mensageiro do bocavírus humano em amostras genotipadas como HBoV1 .....	47
4.11 Análise estatística .....	48
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
5.1 Eficiência da técnica de PCR em tempo real para detecção de Adenovírus humano, Bocavírus humano e Sapovírus .....	50

5.2	Frequência de detecção de Adenovirus, Bocavirus e Sapovirus humanos .....	50
5.3	Somente amostras com $C_t$ entre 30 e 32 na PCR quantitativa para amplificação de adenovirus humano e bocavirus humanos foram positivas na PCR qualitativa ...	50
5.4	Variabilidade genética encontrada nas amostras de Adenovirus humano detectadas.....	52
5.5	Bocavirus humano do tipo 1 foi predominantemente encontrado nas amostras do grupo doença diarréica aguda, enquanto o tipo 2 no grupo infecção respiratória aguda. ....	60
5.6	RNA Mensageiro detectado apenas em amostras de fezes positivas para bocavirus.....	61
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>72</b>

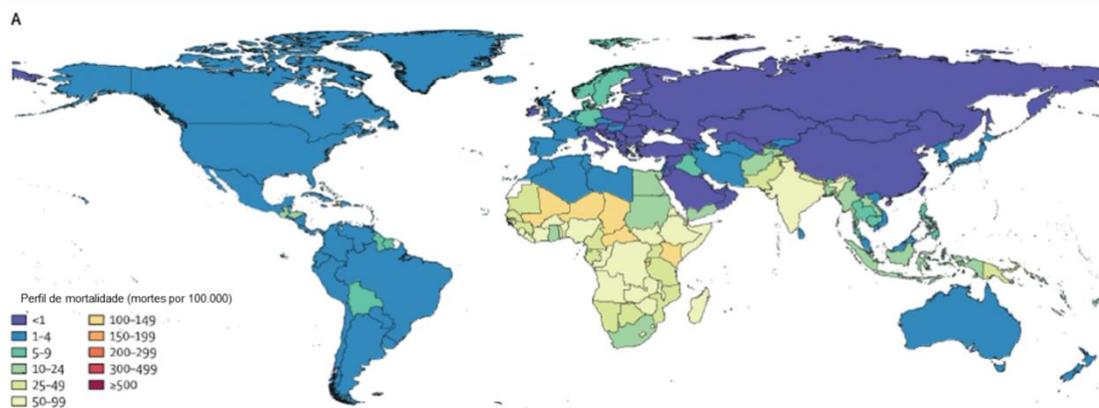
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença diarréica aguda

A doença diarréica aguda (DDA) ou gastroenterite aguda (GA) é a doença mais comum no mundo todo, sendo caracterizada pelo aumento do número de evacuações, com fezes líquidas e de pouca consistência, devido à inflamação do trato gastrointestinal, podendo ser acompanhada de outros sintomas como dores abdominais, febre, náuseas e sintomas mais severos dependendo da gravidade e do agente etiológico causador da infecção, que pode ser de origem viral, bacteriana ou parasitária (PAYNE *et al.*, 2013). A forma de transmissão pode ocorrer por via fecal-oral, sendo caracterizada de forma direta quando transmitida entre humanos ou de animais para humanos, e de forma indireta quando se dá através da ingestão de água e alimentos contaminados e pelo contato com objetos contaminados. O maior risco de transmissão está em locais de uso coletivo como creches, escolas, hospitais e penitenciárias (GRYTDAL *et al.*, 2017).

Devido ao quadro de desidratação intensa, a DDA é uma das principais causas de mortalidade infantil no mundo, levando a óbito mais crianças que o vírus da imunodeficiência humana (HIV), a malária e o sarampo juntos (TROEGER *et al.*, 2018). Embora melhorias nas estratégias de saneamento e prevenção tenham proporcionado uma redução substancial na taxa de mortalidade por DDA de 15% em 2008, para cerca de 9% em 2015, ainda ocorre o equivalente a 500.000 mortes entre crianças menores de 5 anos anualmente no planeta (ALCALÁ *et al.*, 2018), um número que se torna ainda mais preocupante se também for levado em conta regiões subdesenvolvidas, onde mais ocorrem casos de óbito infantil por DDA por conta da falta de saneamento básico, serviço de assistência médica e fome. Nessas regiões, deve-se considerar também a escassez de dados devido ao fato de não haver notificação sistemática em algumas regiões, algo que ocorre na África subsaariana e em vários outros locais no planeta (POP *et al.*, 2014; TROEGER *et al.*, 2018). A figura 1 apresenta o perfil de mortalidade causado por DDA segundo a distribuição mundial.

Figura 1 - Perfil de mortalidade causado por doença diarréica aguda segundo a distribuição mundial



Fonte: (Adaptado de DIARRHOEAL DISEASE COLLABORATORS, 2016).

## 1.2 Panorama da DDA no Brasil e no estado de Roraima

Em 1990 a DDA era a 8ª maior causa de morte no Brasil (BRASIL, 2017). Diante da gravidade da situação, em 1992 foi implantado um programa de vigilância sentinela, denominada Monitorização das DDA (MDDA), posteriormente designada como vigilância epidemiológica das DDA e regulamentada pela Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017. A MDDA foi criada com o objetivo de monitorar o perfil epidemiológico dos casos, visando identificar de forma antecipada surtos especialmente relacionados ao acometimento entre menores de cinco anos, a agentes etiológicos virulentos e epidêmicos e a casos de vulnerabilidade social, como em casos de secas, inundações e desastres. Desde 2006, os casos atendidos nas unidades de saúde sentinelas são registrados no Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica das Doenças Diarreicas Agudas (BRASIL, 2017). Com a atuação da MDDA em auxílio ao sistema nacional de saúde, em 2010 a DDA passou de 8ª para 30ª causa de morte, apresentando uma redução de aproximadamente 82%, o que corrobora a importância e relevância do monitoramento dos casos de DDA (BRASIL, 2017).

Apesar dessa grande diminuição nos casos, a DDA ainda representa causa alarmante de óbitos, principalmente nas áreas do país onde se carece de recursos como saneamento básico e atendimento clínico-hospitalar e há um sistema de notificação precário, características que no cenário nacional acometem principalmente a região norte.

A região norte do Brasil é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Ela está localizada entre o maciço das Guianas (ao norte), o Planalto Central (ao sul) a Cordilheira dos Andes (a oeste), e o Oceano Atlântico (a noroeste). Com extensão territorial de 3.853.322,2 quilômetros quadrados, é a maior Região do território brasileiro (45% da área total do país) e está dentro da região amazônica (figura 2), onde a Amazônia pertencente ao território nacional (Amazônia Legal) corresponde a todos os estados supracitados além dos estados do Maranhão e Mato Grosso, conforme apresentado na figura 2. Apesar da enorme área territorial, o Norte é a região menos povoada do país, sua densidade demográfica conta com 4,1 habitantes por metro quadrado, sendo a menor do Brasil (IBGE, 2011).

Figura 2 - Mapa apresentando os estados do Brasil e países que compõem a Amazônia



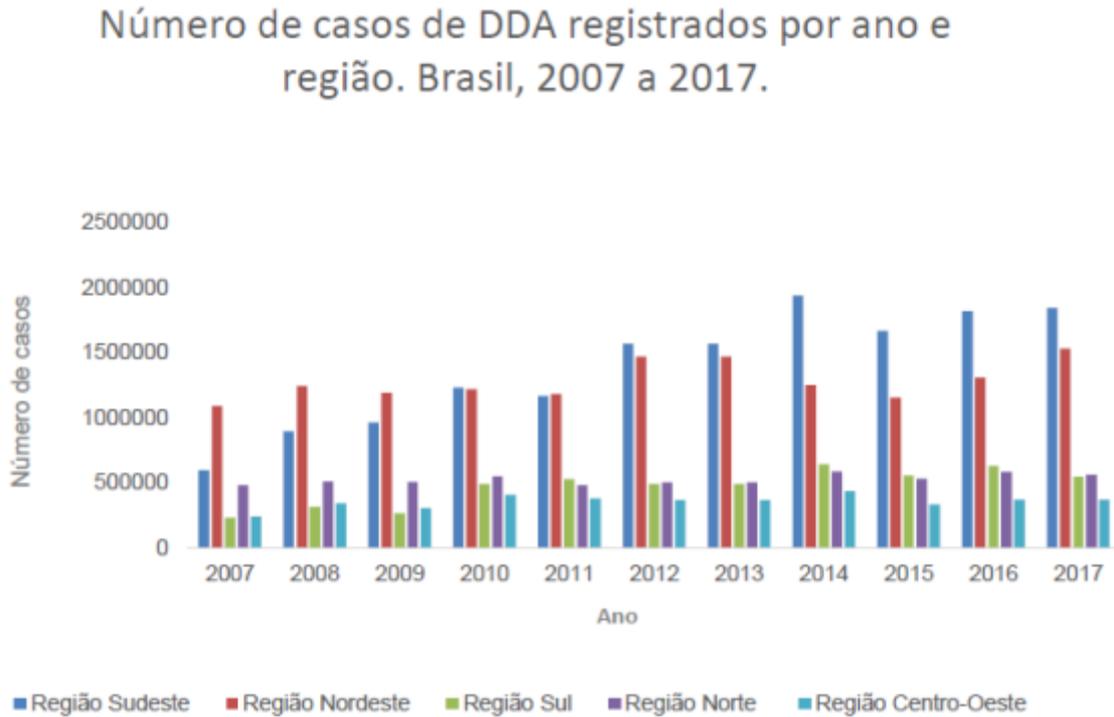
Fonte: (Adaptado de Moraes *et al.*, 2019).

Os estados do norte apresentam problemas sociais, tais como insuficiência de saneamento, altos índices de analfabetismo (atingindo cerca de 10% da população) e mortalidade infantil (aproximadamente 23,5 óbitos a cada mil nascidos vivos) (IBGE, 2015).

Também existem muitos problemas logísticos com relação ao atendimento e tratamento da população, uma vez que há muitas cidades pequenas afastadas dos grandes centros urbanos e comunidades indígenas em regiões remotas, onde não há infraestrutura hospitalar e o acesso é custoso, tornando difícil transportar tanto os próprios pacientes para receber atendimento hospitalar quanto levar até a população dessas áreas vacinas e medicamentos que requerem refrigeração ou condições específicas para manter a integridade do produto.

De acordo com o Sivep – DDA (Sistema informatizado de Vigilância Epidemiológica das DDA), os casos de DDA notificados na região Norte correspondem a 13% do total de casos notificados no país, tendo como base o período correspondente aos anos de 2007 a 2015, ocorrendo principalmente nos meses de janeiro a maio. A Figura 3 claramente mostra a manutenção (morbidade) ao longo dos anos de 2007 a 2017, dos casos de DDA notificados na região norte do Brasil; embora haja declínio da tendência da taxa de mortalidade por DDA na região norte, conforme previamente descrito (BRASIL, 2017).

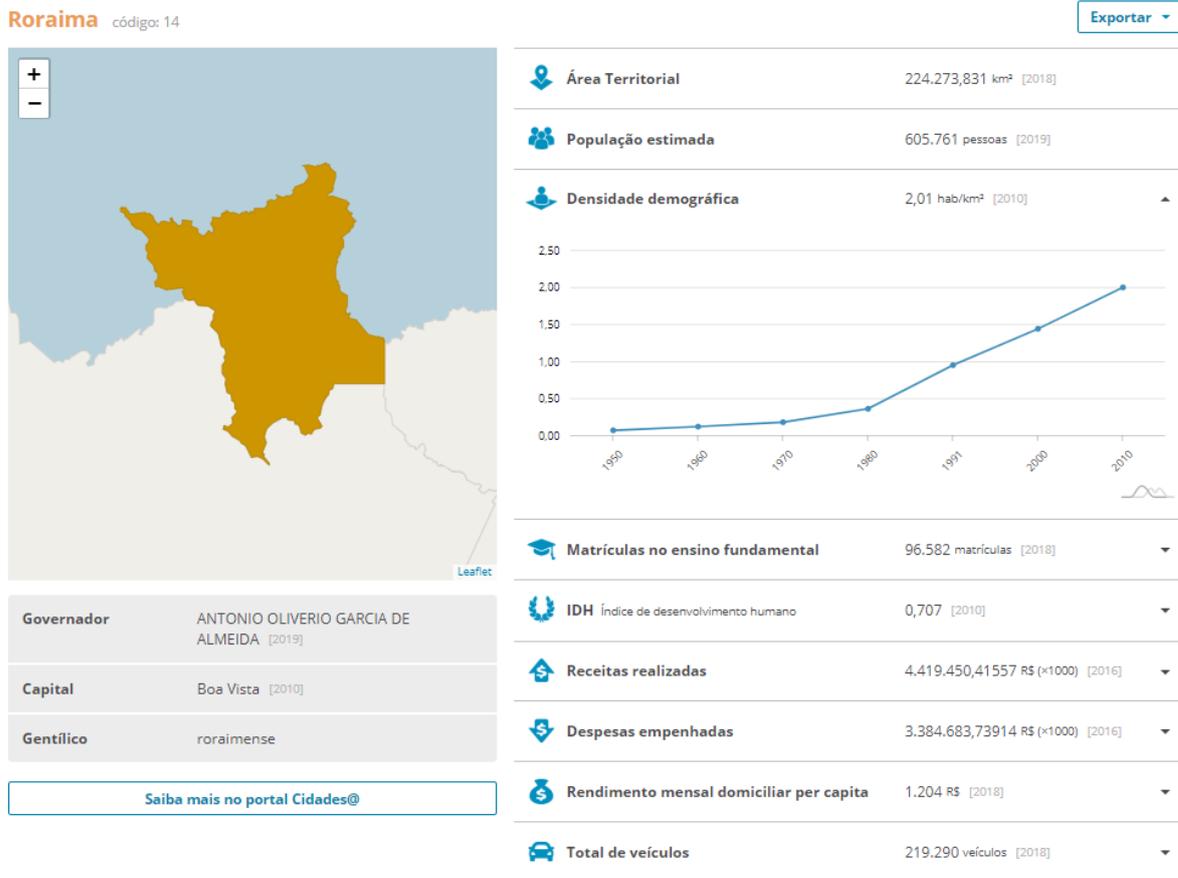
Figura 3 - Casos de DDA notificados durante o período de 2007 a 2017, registrados pelo sistema de vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde



Fonte: (Adaptado de Sivep\_DDA/VEDDA/SVS/Ministério da Saúde).

O estado de Roraima (RR), local onde ocorreu este estudo, é o menos populoso e possui o menor produto interno bruto (PIB) não só da região Norte como do país, com uma população de 605.761 habitantes e PIB de R\$ 9,027 bilhões, segundo estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE). A figura 4 apresenta outras informações gerais a respeito de RR estimadas pelo IBGE.

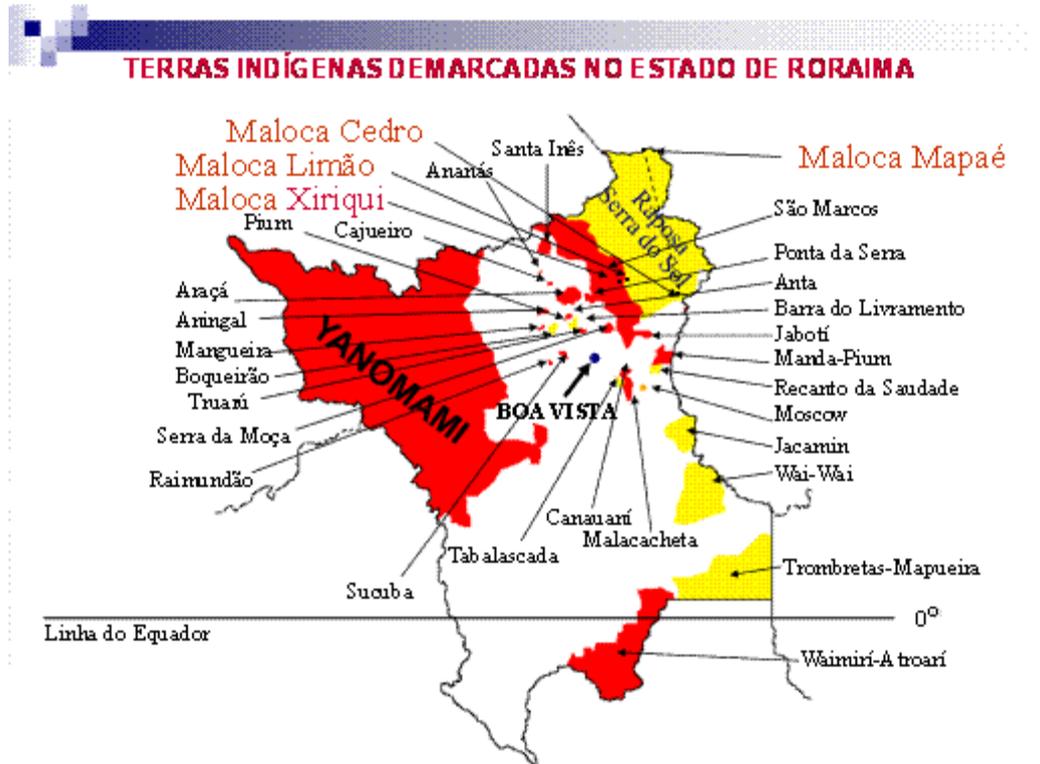
Figura 4 - Informações gerais sobre RR



Fonte: (Adaptado de <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rr.html>, acesso em 31 jan. 2020 11:59).

O estado de RR é situado numa região periférica da Amazônia legal, no noroeste da região Norte do Brasil, fazendo fronteira com a Venezuela ao norte e noroeste e com a República Cooperativa da Guiana ao leste. Dentre a diversidade étnica de brasileiros e estrangeiros, de ambos os países vizinhos que residem em RR, o estado conta com uma enorme população indígena, formada por aproximadamente 46.106 pessoas, sendo o estado do Brasil onde há a maior população indígena vivendo em terras demarcadas, com 83,2%, estando dividida entre as tribos Yanomami, Inaricó, Macuxi, Patamona, Taurepang, Waimiri-Atroari, Wai-Wai e Wapixana. A figura 5 apresenta as terras demarcadas de RR, segundo o IBGE.

Figura 5 - Terras indígenas demarcadas no estado de RR.



Fonte: (Adaptado de <https://folhabv.com.br/noticia/83-2--dos-indigenas-vivem-em-Roraima--diz-IBGE/17782>, acesso em 31 jan. 2020 15:08).

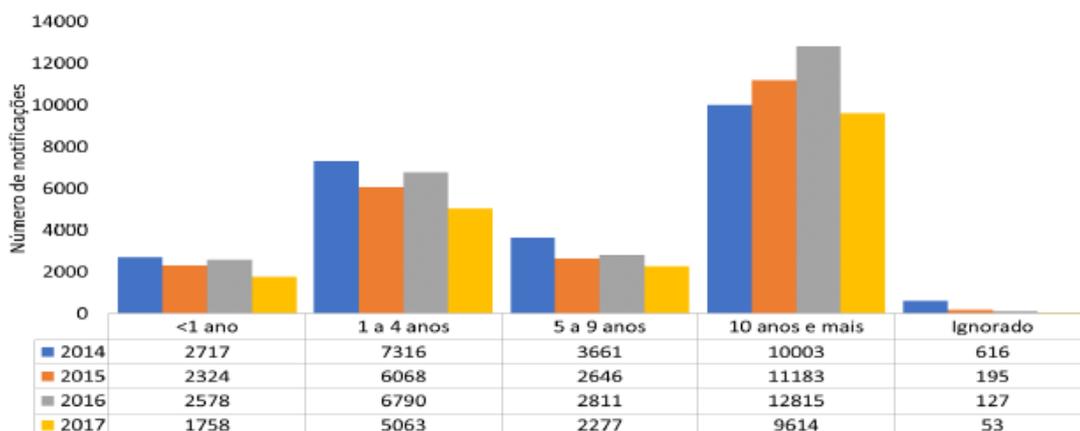
As terras demarcadas geralmente estão longe dos grandes centros urbanos, e conseqüentemente, de infraestrutura hospitalar. Crianças que vivem em tribos indígenas frequentemente são acometidas com infecções respiratórias, devido à ação de queimadas por garimpeiros e contaminação por agentes etiológicos, e por DDA, uma vez que os hábitos culturais favorecem a propagação dos agentes infecciosos causadores dessa enfermidade. Para atender à demanda não apenas de crianças indígenas, mas de todo o estado de RR (e até da Venezuela e da República Cooperativa da Guiana), no ano 2000 foi inaugurado na capital, Boa Vista, o Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), sendo o único hospital infantil da rede pública de RR e referência do Sistema Único de Saúde (SUS). O HCSA atende uma média de 280 crianças por dia entre ambulatório e emergência, dentre as quais muitas apresentam quadros de DDA.

Quanto ao panorama das DDA em RR, entre os anos de 2014 a 2017, foram notificados mediante o preenchimento das planilhas da área técnica e do Sivep-DDA no estado de RR, 90.558 casos. Em 2017 foram 18.762 casos de DDA. Na semana epidemiológica (SE) 07, foi verificado um aumento de números de casos detectados pelo MDDA, sendo 556 casos no total. Destes, em menores de um ano de idade

foram notificados 48 casos, além de 171 crianças com idade entre 1 a 4 anos 57 casos entre crianças de 5 a 9 anos e acima de 10 anos foram 280 casos. No município de Iracema esse aumento foi significativo, passando de zero na SE 01, para 24 casos na SE 07, tornando a baixar e se manter estável nas semanas seguintes. Os municípios de Boa Vista, Caracaraí e Rorainópolis apresentaram um número de notificações maior em 2016 em relação aos outros anos. Foram 131 unidades sentinelas monitorando, o que pode ter contribuído com o aumento no número de casos deste ano, segundo o Relatório Anual de Epidemiologia 2017 (BENEDETTI, 2018).

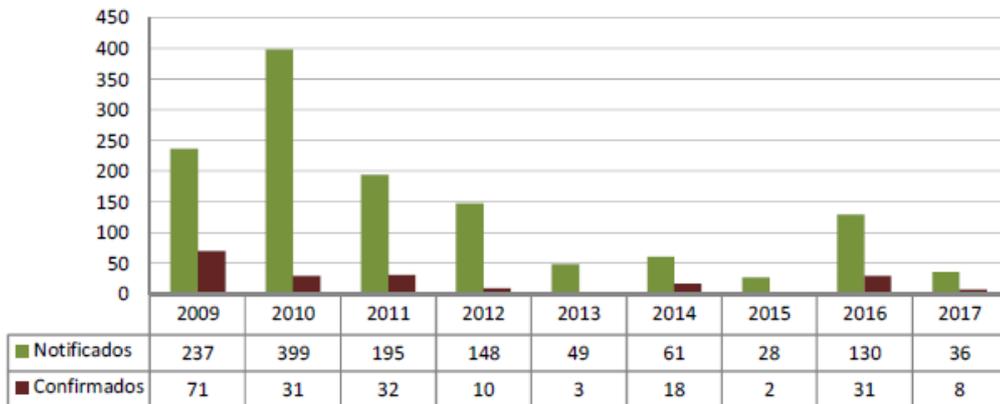
O ano de 2017 apresentou o menor número de casos para os municípios de Alto Alegre, Boa Vista, Caracaraí, Caroebe, Mucajaí, Normandia, Pacaraima, Rorainópolis, São Luiz e Uiramutã até a SE 47. Em relação à prevalência das DDA por idade, observa-se que a faixa etária mais acometida foi de dez anos ou mais. Isto, segundo o Relatório Anual de Epidemiologia 2017 (BENEDETTI, 2018) se deve principalmente ao número de indivíduos que compõem essa faixa, pois se trata de um universo de pessoas bastante elevado. Cabe ressaltar, contudo, que o perfil epidemiológico das DDA nos dias de hoje vem se alterando, tendo em vista, principalmente, o surgimento de novos patógenos, denominados emergentes. As figuras 6 e 7 resumem a situação das DDA em RR.

Figura 6 - Distribuição das notificações de DDA em RR por faixa etária entre 2014 e 2017



Fonte: (Adaptado de BENEDETTI, 2018).

Figura 7 - Número de notificações de DDA e casos confirmados positivos de rotavírus A no período de 2014 a 2017



Fonte: (Adaptado de BENEDETTI, 2018).

Um terço dos casos de DDA está associado a infecções virais, sendo a maioria associada aos rotavírus, algo corroborado por estudos recentes como o de Anwari e colaboradores (2018) que descreve a hospitalização de crianças no afeganistão acometidas com DDA entre 2013 e 2015 e o de Kumar e colaboradores (2018), que faz um *review* retrospectivo de casos de crianças com DDA atendidas em unidades de atendimento intensivo pediátrico na Índia durante o período de 2012 a 2017, fazendo um comparativo entre os casos de crianças que sobreviveram com as que vieram a óbito.

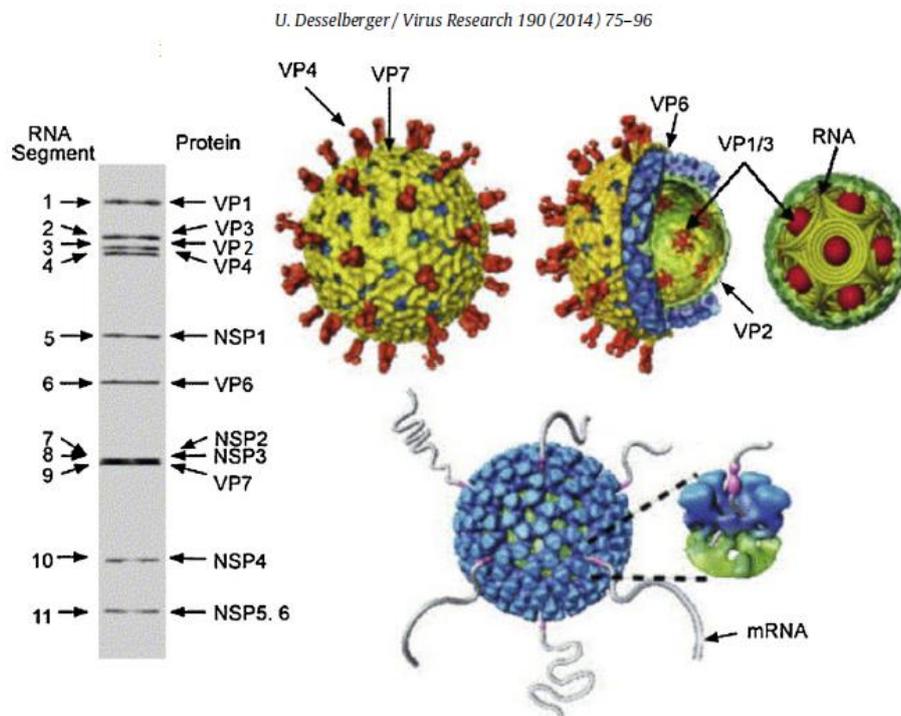
### 1.3 Rotavírus

Os rotavírus (RV) foram descritos pela primeira vez no ano de 1973 na Austrália, em Melbourne, através da microscopia eletrônica de células epiteliais da mucosa duodenal de crianças apresentando quadro de diarreia aguda não bacteriana, por Bishop *et al.* (1973). Ainda em 1973, um grupo de pesquisadores na Inglaterra também detectou por microscopia eletrônica partículas virais de RV nas fezes de crianças com DDA (FLEWETT *et al.*, 1973). Após passar por denominações como *Orbivirus*, *Reovirus-like* e *Duovirus*, recebeu o nome de *Rotavirus*, tendo o sufixo *rota* originado da palavra “roda” em latim, objeto ao qual se assemelha quando examinado por microscopia eletrônica (FLEWETT; WOODE, 1978).

Os RV são membros da família *Reoviridae*, são vírus não envelopados e com partícula de aproximadamente 100nm de diâmetro, possuindo formato icosaédrico.

Seu genoma é composto por 11 segmentos de RNA fita dupla, cada um deles um gene que codifica uma proteína, totalizando 6 proteínas estruturais (*Viral proteins* - VPs) e 5 proteínas não estruturais (*Non-structural proteins* - NPSs)(DESSELBERGER, 2014), conforme demonstrado na figura 8.

Figura 8 - Estrutura e proteínas do rotavírus. A esquerda a representação de um gel de poliacrilamida apresentando a localização dos 11 segmentos genômicos virais e as proteínas codificadas por cada segmento, enquanto a direita ilustrações da estrutura do RV



Fonte: (Adaptado de DESSELBERGER, 2014).

Os RV se dividem entre grupos de A até G, onde os grupos A, B e C são os responsáveis por infecções em humanos, sendo os do grupo A (RVA) muito mais frequente enquanto os outros dois raramente detectados (PATTON, 2012). Os sorotipos de RV são definidos pelas proteínas virais VP7(G) e VP4(P), dos quais atualmente se tem 14 sorotipos G conhecidos, onde 10 têm sido descritos como infectantes em humanos (DESSELBERGER, 2014). Mundialmente são 6 os sorotipos de RVA prevalentes: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] e G12P[8]. Constituem genótipos reemergentes pós-vacinais: G2P[4], G3P[8], G9P[8] e G12P[8], este último o principal genótipo detectado em crianças e adultos com DDA viral (RODRIGUES, 2014; SILVA, 2014).

O RVA é transmitido principalmente por meio de via fecal-oral por contato de pessoa a pessoa ou com fômites (objetos contaminados), também pode ocorrer por consumo de água e/ou alimentos contaminados, sendo uma forma mais rara. Possui um período de incubação de um a três dias e afeta principalmente crianças menores de cinco anos de idade, em especial os menores de dois anos (PAYNE *et al.*, 2013). Infecções em crianças mais velhas e em adultos também ocorrem, apesar de serem menos comuns, sendo geralmente casos a surtos ou de ocorrência em grupos populacionais submetidos à risco como hospitais, creches, escolas, berçários, asilos ou viajantes que foram para áreas epidêmicas (PATTON, 2012).

Sua infecção se manifesta por meio da DDA, com diarreia de característica aquosa e aspecto gorduroso, podendo ser acompanhada de vômito e febre alta em casos mais graves (PAYNE *et al.*, 2013). Em crianças menores de dois anos pode causar um quadro clínico grave de desidratação e distúrbios hidroeletrólíticos com acidose metabólica, quadro este que somado ao fato de ser uma doença de fácil transmissão, explica os RVA ser o motivo da alta taxa anual de mortalidade infantil, acometendo principalmente regiões subdesenvolvidas, devido a precárias condições de vida como má alimentação, desidratação, falta de saneamento básico e de serviço hospitalar para diagnóstico e tratamento adequado (ANWARI *et al.*, 2018).

O diagnóstico é obtido mediante exame laboratorial, no qual é verificada a presença do vírus nas fezes do paciente. É realizada a extração do RNA do vírus e análise do mesmo, podendo ser por meio da reação em cadeia polimerase com transcriptase reversa (*reverse transcription polymerase chain reaction* ou RT-PCR), ensaio de imunoabsorção enzimática (*enzyme linked immunosorbent assay* ou ELISA), microscopia eletrônica, cultura e algumas outras técnicas menos difundidas (PAYNE *et al.*, 2013). O tratamento se baseia essencialmente em prevenir a desidratação e distúrbios hidroeletrólíticos a partir da manutenção da dieta normal, e caso a mesma não seja suficiente, é necessário recorrer à reposição por via parenteral (RAMANI; KANG, 2009).

Em 2006, a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) declararam como prioridade a vacinação contra o RVA nos Programas Nacionais de Imunização (PNI), com a meta de prevenir mortes e hospitalizações causadas por estes vírus.

## 1.4 Vacinação

O PNI Brasileiro foi criado em 1973, tendo como objetivo normatizar a imunização nonível nacional, buscando o controle ou erradicação das doenças infectocontagiosas e imunopreveníveis, como a poliomielite, sarampo, difteria, coqueluche, tuberculose, entre outras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). O PNI faz parte da OMS, mas recebe ajuda técnica e financeira do Fundo das Nações Unidas para Infância - UNICEF (TEMPORÃO, 2003).

Introduzir uma vacina num cronograma nacional de vacinação depende de diversos fatores, como o impacto local gerado pela doença, em termos de mortalidade e morbidade, custos e efetividade da vacina, capacidade de vigilância e de diagnóstico, prioridade em saúde e eventos adversos, além dos objetivos em políticas de saúde pública, como por exemplo, tentar reduzir o índice de internações (ALCALÁ *et al.*, 2018). Levando todos esses fatores em consideração, foi introduzida no calendário de vacinação do Brasil e de outros países da América Latina a vacina oral rotavirus humano (VORH) Rotarix<sup>®</sup> (RV1), manufaturada pela empresa Glaxo Smith Kline Biologicals. É uma vacina monovalente e atenuada, derivada de uma amostra humana G1P[8]. Também foi licenciada a vacina RotaTeq<sup>®</sup> (RV5) produzida pela Merck, originada a partir de reestruturações genéticas entre amostras humanas e bovina, com os genótipos G1P[5], G2P[5], G3P[5], G4P[5] e G6P[8], sendo pentavalente e atenuada. É oferecida no Brasil apenas em laboratórios particulares (PAYNE *et al.*, 2013).

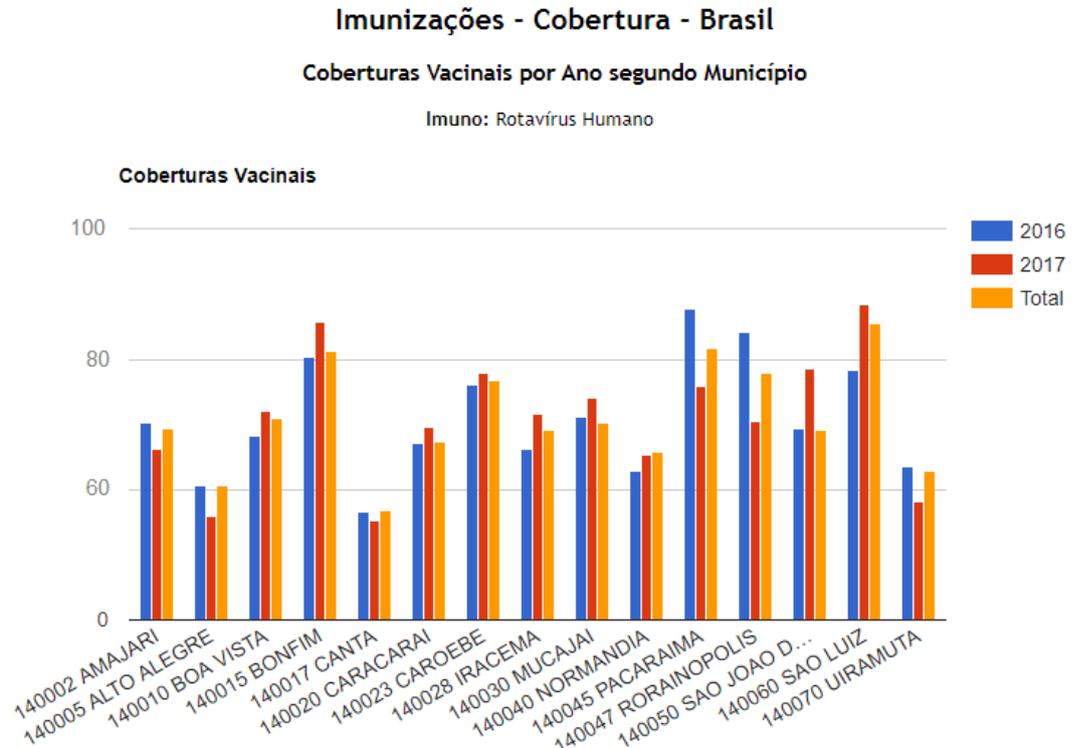
A vacinação com a RV1 é feita em duas doses, enquanto com a RV5 em três doses, havendo um intervalo mínimo de 4 semanas entre as doses. Para ambas as vacinas, a primeira dose deve ser aplicada a partir de 6 semanas e até 14 semanas de vida e a última dose até 7 meses. Se o neonato perder a primeira dose, não poderá mais ser vacinado (PATTON, 2012).

Dados do Ministério da Saúde publicados em outubro de 2015 (BRASIL, 2015), apontaram uma cobertura vacinal abaixo das metas estabelecidas para a RV1, uma vez que os percentuais alcançados ficaram abaixo do preconizado (meta pactuada acima de 95%). Na verdade, os resultados para o país como um todo mostraram que a proporção de abandono para a maioria das vacinas do calendário infantil variou entre média e alta no período de 2010-2014. Registra-se o alto índice de abandono para a RV1, provavelmente, devido à dilatação da possibilidade de

aplicação da 2ª dose entre quatro e sete meses. As coberturas para a RV1 registradas para os anos de 2010-2014 foram: 2010 - 83,0%; 2011 - 87,1%; 2012 - 86,4%; 2013 - 93,3% e 2014 - 92,0% (BRASIL, 2015).

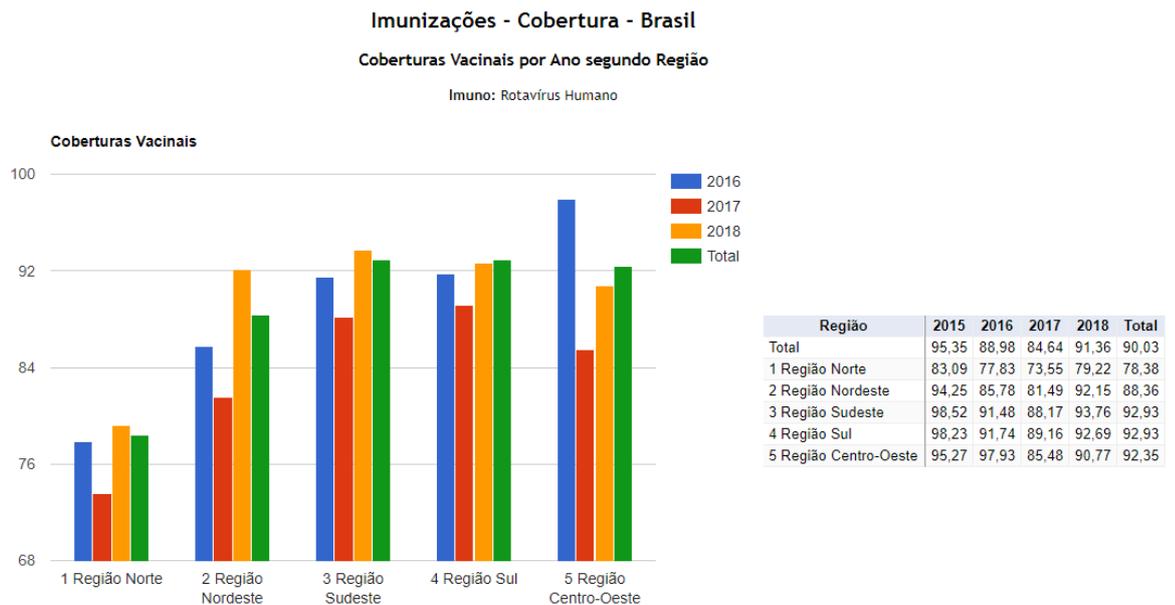
Em dados mais recentes obtidos na plataforma online do datasus, todos os municípios de Roraima apresentaram cobertura vacinal abaixo da meta ideal de 95% entre os anos de 2016 e 2017, onde apenas os municípios de Pacaraima e Rorainópolis tiveram uma cobertura acima de 80% em 2016, e em 2017 apenas Bonfim e São Luiz, conforme apresentado na figura 9. Quando comparamos a média de cobertura vacinal entre os anos de 2015 a 2018 de todas as regiões do país, a partir dos dados presentes na figura 10, é possível observar que a região Norte possui uma cobertura vacinal muito abaixo das demais, tendo atingido uma média acima de 80% apenas no ano de 2015 e estando abaixo disso nos anos subsequentes. A meta de uma cobertura vacinal acima de 95% foi atingida pelas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste em 2015 e apenas no Centro-Oeste em 2016, não sendo mais atingida por nenhuma região nos anos subsequentes. Estes resultados apresentam uma variação entre média e alta nas proporções de abandono da VORH, algo que se deve provavelmente à dilatação da possibilidade de aplicação da 2ª dose entre quatro e sete meses.

Figura 9 - Resultados da cobertura vacinal da RV1 no período de 2016 a 2017 para os 15 municípios do estado de Roraima



Fonte: (Dados obtidos em [http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/webtabx.exe?bd\\_pni/cpnibr.def](http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/webtabx.exe?bd_pni/cpnibr.def), acesso em 31 jan. 2020 15:23).

Figura 10 - Resultados da cobertura vacinal da VORH entre os anos de 2015 e 2018 para as regiões do Brasil

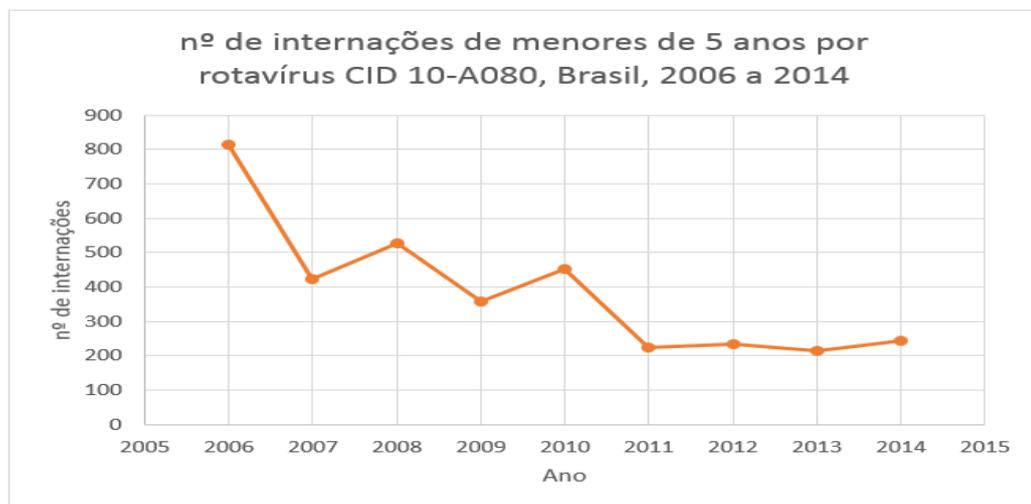


Fonte: (Dados obtidos em [http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/webtabx.exe?bd\\_pni/cpnibr.def](http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/webtabx.exe?bd_pni/cpnibr.def), acesso em 31 jan. 2020 15:23).

## 1.5 Outros vírus causadores de DDA

Apesar do alto índice de abandono da RV1, ainda assim a vacinação resultou em uma queda no número de casos registrados de RVA nos últimos anos, conforme dados do Ministério da Saúde publicados em 2015, conforme mostra a figura 11 (BRASIL, 2015).

Figura 11 - Número de internações por diarreia associadas ao rotavírus A em crianças menores de 5 anos no Brasil, no período de 2006 a 2014 (pós-vacinal)



Fonte: (Adaptado de BRASIL, 2015).

Embora tenha ocorrido essa queda com relação aos casos de DDA registrados, grande parte dos casos não são notificados, principalmente nas regiões que carecem de recursos, onde o número de ocorrências costuma ser maior. Casos de reinfecções em crianças vacinadas também vêm sendo relatados, algo que pode estar associado a um novo genótipo circulante ou a ascensão de outro vírus causador de DDA (DORÓ *et al.*, 2014; HEMMING; VESIKARI, 2014).

Neste contexto, o Norovirus vem cada vez mais crescendo como causador de DDA em crianças em várias regiões do planeta, principalmente na América do Norte (LIVELY *et al.*, 2018). Outros vírus causadores de DDA que vêm sendo detectados são os Adenovirus (HAdV), Bocavirus (HBoV) e Sapovirus (SaV), todos alvo de detecção desse estudo.

### 1.5.1 Norovirus

Pertence a família *Caliciviridae*, a qual possui os gêneros *Norovirus*, *Sapovirus*, *Nebovirus*, *Vesivirus* e *Lagovirus*, onde os gêneros *Norovirus* e *Sapovirus* formam o grupo de calicivírus que infectam humanos (DE GROOT *et al.*, 2011).

Os Norovirus podem ser classificados em 7 genogrupos (GI a GVII), se baseando na análise de sequência nucleotídica da região que codifica a proteína VP1 (VINJÉ, 2015), onde os genogrupos GI, GII e GIV estão associados a infecção em humanos. Os genogrupos (G) são compostos por genótipos (GG), os quais são a menor unidade de classificação dos Norovirus, que consiste em agrupar por similaridade de nucleotídeos e de aminoácidos em determinado ramo de uma árvore filogenética (ZHENG *et al.*, 2006).

Os Norovirus possuem partículas virais esféricas e não envelopadas, medindo cerca de 40nm de diâmetro e constituídas por um capsídeo viral originário da proteína estrutural VP1. Seu genoma é composto por um RNA fita simples de aproximadamente 7,7kb de tamanho, com polaridade positiva e apresentando três regiões de leitura aberta (*Open Reading Frame* – ORF) (VINJÉ, 2015). A extensão da ORF1 equivale a cerca de 60% do genoma viral, e codifica uma poliproteína que origina as 7 proteínas não estruturais do Norovirus (NS1 a NS7). A ORF2 codifica a proteína estrutural VP1 e a ORF3 codifica outra proteína estrutural chamada VP2, responsável por regular a expressão da VP1 (HARDY, 2005).

Fatores como surgimento de novas cepas devido ao acúmulo de mutações nucleotídicas pontuais e recombinações genéticas durante uma coinfeção por ao menos duas cepas contribuem para que os norovirus estejam em constante evolução (EDEN *et al.*, 2013). A área da junção entre as ORF1 e ORF2 é onde geralmente ocorrem as recombinações, e uma variedade de cepas recombinantes tem sido detectadas ao redor do mundo (ARANA *et al.*, 2014).

### 1.5.2 Adenovirus

Denominados com esse nome em 1956 devido ao fato de terem sido descobertos em células primárias de adenoides humanas, o adenovírus humano (HAdV) entérico é considerado um dos agentes etiológicos mais importantes da doença diarréica infantil em todo mundo, podendo ainda afetar jovens e adultos,

principalmente em períodos de surto (BERK, 2013). Sua transmissão ocorre por meio de via fecal-oral, através de água ou alimentos contaminados. Alguns sorotipos são capazes de estabelecer infecções assintomáticas e continuar sendo excretados pelas fezes por meses ou até anos (FLINT *et al.*, 2009).

A família *Adenoviridae* é subdividida em cinco gêneros: Aviadenovirus, Mastadenovirus, Atadenovirus, Siadenovirus e Ichtadenovirus. Os responsáveis por infecções em humanos estão classificados no gênero Mastadenovirus, constituído de 57 sorotipos e estão divididos em 7 espécies designadas de A a G, de acordo com suas propriedades físico-químicas, bioquímicas e imunológicas. Os sorotipos associados à infecção entérica são os HAdV 40 e 41, os dois únicos membros da espécie F (SOARES *et al.*, 2009).

Estruturalmente possuem genoma composto por DNA fita dupla, linear e não segmentado. As partículas virais são icosaédricas, medindo aproximadamente 90nm de diâmetro compostas por proteínas e não apresentam envelope lipídico (FLINT *et al.*, 2009).

Infecções entéricas causadas por HAdV têm o período de incubação de aproximadamente 8 dias, estando menos associada a febre alta e desidratação do que a doença diarréica causada por rotavírus, porém ainda assim pode trazer vômito e febre como sintomas (BERK, 2013).

### 1.5.3 Bocavirus

Sendo um vírus recentemente caracterizado, o bocavirus humano (HBoV) foi identificado em 2005 em amostras de nasofaringe de pacientes com doença respiratória (ALLANDER *et al.*, 2005). A princípio foi proposto como agente etiológico de doença respiratória, porém vem sendo encontrado em amostras fecais de pacientes acometidos com DDA. No Brasil, a circulação do HBoV foi demonstrada pela primeira vez por Albuquerque e colaboradores em 2007 (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

Os HBoV são classificados na família *Parvoviridae*, no gênero Bocavirus, possuindo até o momento quatro espécies identificadas: HBoV1, HBoV2, HBoV3 e HBoV4, de forma que o HBoV1 é descrito na literatura como causador de infecção respiratória aguda (IRA) e os demais como causadores de DDA (ALLANDER, 2008).

O HBoV4 é o mais raro de ser detectado, e sua circulação nunca foi descrita no Brasil.

O papel dos HBoV como agentes etiológicos gastroentéricos ainda não está totalmente definido. Sintomas gastrointestinais são observados em até - em média - 25% dos pacientes com doença respiratória positivos para HBoV, o que sugere que a espécie HBoV1 pode não se limitar apenas ao sistema respiratório, como ocorre com o bocavírus bovino e canino (ARTHUR *et al.*, 2009; BLINKOVA *et al.*, 2009).

Sua rota de transmissão parece seguir o modelo tradicional dos vírus respiratórios e dos vírus gastroentéricos (ALLANDER, 2008).

#### 1.5.4 Sapovirus

Após um surto de gastroenterite em 1977 na cidade de Sapporo, no Japão, foi identificado por meio de microscopia eletrônica um vírus morfológicamente semelhante ao Norovirus, denominado Sapovirus. A denominação do gênero se deu devido ao nome da cidade onde houve o isolamento (SCHLENKER; SURAWICZ, 2009). Assim como os norovirus, os sapovirus pertencem à família *Caliciviridae*, porém se diferem na epidemiologia e sintomatologia, por exemplo, crianças de dois anos de idade infectadas por norovirus apresentam como sintoma predominante gastroenterite moderada a grave, com vômito sendo o sintoma predominante. Já no caso de infecção por sapovirus, DDA é o mais comum (JOHNSEN *et al.*, 2009).

Sapovirus é um gênero, sendo o Saporovirus sua única espécie. Possui 7 genogrupos, indo de GI a GVII (G1 a G7) sendo os GI, GII, GIV e GV responsáveis por infectar humanos (HANSMAN *et al.*, 2007). Estruturalmente possui simetria icosaédrica, com diâmetro de 27 a 40 nm, sendo não envelopados e apresentando RNA fita simples (BORGES; CARDOSO, 2005).

Sua transmissão se dá por via fecal-oral, estando associado à ingestão de água e alimentos contaminados (OKA *et al.*, 2015).



## 2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Este estudo é parte de um projeto maior que tem como objetivo principal identificar os vírus causadores de DDA, em uma coorte de crianças de 0 a 5 anos atendidas no HCSA, do estado de Roraima, em Boa Vista. De 11 de outubro de 2016 a 10 de outubro de 2017, foram coletadas 734 amostras de fezes e 734 amostras de saliva de crianças de 0 a 5 anos, resultando em 1.468 amostras de um projeto colaborativo para detecção de RVA e Norovirus, entre a Universidade Federal de Roraima (UFRR), o HCSA e a Fiocruz - Instituto Oswaldo Cruz - Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) sendo este Laboratório de Referência da OPAS (Américas e Caribe) e Regional do Ministério da Saúde em rotavíruses. Por meio de entrevistas com as mães das crianças e análise do certificado de vacinação, foi inicialmente verificado que mais de 36% das crianças com DDA e mais de 47% das crianças do grupo controle não apresentavam vacinação com RV1, embora estivessem em idade recomendada para receberem a vacina (Tabela 1). Isso nos levou a identificar esta coorte como interessante para estudar a ocorrência de outras infecções virais causadoras de DDA (não RVA), avaliar como está sendo conduzida a vacinação com RV1 em Boa Vista e outros fatores que podem contribuir para a morbidade e mortalidade em crianças menores de 5 anos, causadas por DDA.

Tabela 1 - Crianças vacinadas com os RVA atendidas no HCSA. 0 = nenhuma dose vacinal, 1 = uma dose vacinal e 2 = duas doses vacinais. Amostra = crianças com DDA e Controle = crianças sem DDA

VACINA ROTAVIRUS	AMOSTRA		CONTROLE	
	Frequência	Freq. %	Frequência	Freq. %
0	84	36,84	57	47,50
1	53	23,25	20	16,67
2	91	39,91	43	35,83
TOTAL	228	100,00	120	100,00

Obs: Valor  $p = 0,139$ . Teste Mann-Whitney U.  
Fonte: (Do autor, 2020).

Como citado anteriormente, a capacidade de vigilância é um dos aspectos indispensáveis para a prevenção e monitoramento de surtos e para a inserção de uma vacina no calendário de imunização nacional. O presente estudo busca trazer respostas quanto a esse aspecto para o PNI com relação a vacina RV1, fazendo a verificação da possível ascensão de vírus emergentes em uma região que recentemente tem recebido grande fluxo migratório da Venezuela sem ter infraestrutura para abrigar e prestar atendimento hospitalar a tantos imigrantes, resultando em muitas pessoas vivendo nas ruas em condições precárias. Todos esses são fatores que contribuem para migração e propagação de vírus. A região também conta com muitos imigrantes da República Cooperativa da Guiana, além de possuir diferentes populações indígenas.

Além do aspecto epidemiológico, a vigilância também se faz a partir da reflexão a respeito do funcionamento do PNI em atender regiões distantes dos centros urbanos, que carecem de recurso e requerem maior investimento em questões logísticas, como rede de frio para manter as ampolas de vacina em temperatura ideal e o transporte das mesmas. Uma vez que é dito na constituição que a saúde é um direito de todos sem distinção e dever do estado, tais dificuldades devem ser superadas para que não haja negligência em atender quem vive em regiões remotas do Brasil.

A detecção de vírus que possuem espécies gastroentericas e respiratórias em amostras de fezes e saliva também pode gerar resultados interessantes, como a possibilidade da ocorrência de coinfeções dentro do organismo pelo mesmo vírus.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Realizar um estudo epidemiológico da circulação dos vírus causadores de DDA e de IRA em uma coorte contendo amostras de casos de DDA e IRA, de crianças atendidas no HCSA de 0 a 5 anos, vacinadas e não vacinadas com RV1.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Padronizar as técnicas de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) e de transcrição reversa seguida de qPCR (RT-qPCR) para identificação de agentes virais causadores de DDA (HAdV, HBoV e SaV) e as utilizar na detecção dos mesmos.
- Realizar sequenciamento pelo método de Sanger de amostras positivas para HAdV e HBoV, para definição do genótipo/subgenótipo circulante e utilizar ferramentas de informática para análises de sequências, por comparações com estirpes virais padrões disponíveis em bancos de genomas virais.
- Analisar criticamente, utilizando ferramentas de bioestatística, a incidência dos vírus acima detectados, e também de RVA e norovirus (dados disponíveis no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental – LVCA), nos dois grupos de crianças vacinadas e não vacinadas com RV1, da coorte em questão com DDA e com IRA.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Comitê de ética

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Criança de Boa Vista/Plataforma Brasil sob o número 133480 de 23/11/2015. As crianças foram acompanhadas durante o atendimento e coleta das amostras pelo Dr. Alberto Ignácio Olivares de Olivares, médico pediatra e professor da Universidade Federal de Roraima (UFRR). Todas as mães das crianças são moradoras de RR-Brasil ou de países da fronteira com o Brasil (Venezuela e República Cooperativa da Guiana) e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). A etnia indígena de cada criança participante deste estudo não pode ser considerada uma vez que as mesmas não se autodeclaram como tais. No entanto hábitos, costumes, e traços físicos (fenótipo) podem relacioná-las como tendo uma origem étnica indígena.

### 4.2 Desenho do estudo, população de estudo (coorte) e tamanho da amostra

A coorte de estudo é do Hospital da Criança de Boa Vista, localizado na cidade de Boa Vista, RR, que possui 30 leitos de observação na Emergência e 80 leitos para Internação. Considerando o censo da população pediátrica  $\leq 5$  anos de RR (IBGE-RR, 2010), existiam 47.603 crianças. O cálculo amostral com margem de erro (ME) de 5% foi estimado em N amostral de 384 crianças (o cálculo amostral foi baseado no censo de 2010 do IBGE - população de crianças até 5 anos de idade - utilizando a ferramenta *online* disponível no site <https://comentto.com/calculadora-amostral>). A coleta das amostras foi realizada entre 11 de outubro de 2016 e 10 de outubro de 2017, no atendimento de Emergência (tabela 2). Considerando o período e o N amostral, foram coletadas 485 amostras de fezes e saliva (em pacientes com DDA) e 249 amostras de fezes e saliva de indivíduos controle (sem DDA). As amostras foram utilizadas anteriormente para detecção de RVA e norovirus e para estudos de susceptibilidade genética à infecção viral (saliva) (MORAES *et al.*, 2019), e no presente trabalho para detecção de HAdV, HBoV e SaV.

Tabela 2 - Relação de amostras de fezes e saliva recebidas por mês enviadas pela UFRR no período de outubro de 2016 a outubro de 2017

<b>Mês e ano de coleta</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Numeração*</b>
Outubro de 2016	32 amostras	De 26190 até 26220
Novembro de 2016	32 amostras	De 26222 até 26252
Dezembro de 2016	34 amostras	De 26254 até 26284 + 26579
Janeiro de 2017	58 amostras	De 26286 até 26308havendo pulo para 26563 até 26605
Fevereiro de 2017	124 amostras	De 26607 até 26729
Março de 2017	168 amostras	De 26731 até 27171
Abril de 2017	240 amostras	De 27173 até 27411
Maio de 2017	188 amostras	De 27413 até 27435 havendo pulo para 27587 até 27747
Junho de 2017	40 amostras	De 27749 até 27787
Julho de 2017	106 amostras	De 27789 até 27893
Agosto de 2017	242 amostras	De 27895 até 28067 havendo pulo para 28262 até 28328
Setembro de 2017	140 amostras	28330 até 28468
Outubro de 2017	64 amostras	28470 até 28540

\*- A numeração corresponde ao número recebido no banco de dados do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, referente a uma amostra de fezes e uma de saliva para cada criança. Na quantidade de amostras, metade equivale a fezes e metade a saliva.

Fonte: (Do autor, 2020).

### 4.3 Avaliação clínico-epidemiológica dos casos de DDA

A avaliação clínica foi realizada pelo médico pediatra do HCSA, Dr. Alberto Ignácio Olivares de Olivares. Foram consideradas para a coleta de amostras, crianças menores de 5 anos, com 24 horas de evolução de quadro diarreico, com febre, vômito, dor abdominal ou não. Para coletas de amostras do grupo controle, foram consideradas crianças menores de 5 anos, com 24 horas de internação com quadro clínico de IRA. Além do exame clínico, foram coletadas as fezes diretamente das fraldas, com auxílio de gaze e/ou palheta presente na parte de baixo da tampa do pote de fezes. As amostras de saliva foram coletadas esfregando um *swab* algumas vezes em cada lado da parte interna da bochecha das crianças. Os dados laboratoriais complementares foram obtidos através do prontuário e também do cartão de vacina de cada criança.

#### 4.4 Localização das amostras

As amostras clínicas coletadas foram armazenadas a -20°C no Laboratório do Instituto OBSERVARR (UFRR) e foram enviadas a cada dois meses ao LVCA, ficando todas armazenadas em freezers a -20°C.

#### 4.5 Processamento das amostras

A partir das amostras de fezes, foram preparadas suspensões fecais como previamente descrito por Ferreira *et al.* (2010) e conservadas a -20°C e posteriormente foi realizada a extração dos ácidos nucleicos totais. Para tal técnica, foi utilizado 140µL da suspensão fecal previamente preparada, no kit comercial *QIAamp Viral RNA Mini* (Qiagen, CA, USA) no sistema automatizado *QIAcube®* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, também foi empregado o método de Boom (BOOM *et al.*, 1990) quando não possível utilizar o sistema automatizado. Os ácidos nucleicos foram conservados a -70°C. As amostras de saliva foram preparadas com a adição de 1ml de tampão PBS 1x, seguido de 1 minuto agitando o tubo em vortex (com o *swab* dentro) e retirando 400µl para alíquota de uso, enquanto o restante ficou como *backup* (-20°C). Para extração dos ácidos nucleicos das amostras de saliva foi utilizado apenas o método de Boom (BOOM *et al.*, 1990), onde usou-se 200µl da alíquota de uso diluído em 200 µl de PBS 1x (volume final de 400µl). Os ácidos nucleicos extraídos foram conservados a -70°C.

#### 4.6 Detecção dos vírus

Os ácidos nucleicos extraídos das amostras foram submetidos ao qPCR multiplex para detecção dos vírus de DNA HAdV e HBoV, posteriormente a um RT-qPCR para detecção do Sapovirus.

Foi utilizado o método TaqMan com o kit *QuantiTect® Multiplex PCR Kit* da Qiagen (Catálogo nº 204543 )para detecção de HAdV e HBoV e o kit *SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR 500 kit* da Thermo Fisher Scientific (Catálogo nº 11732020) para detecção de SaVem placas de 96 cavidades no aparelho *7500 Real Time PCR System®* (Applied Biosystems, USA). A tabela 3 apresenta as

informações de sonda, primer, G-Block e controle positivo utilizado para detectar cada amostra.

Tabela 3 - Relação de insumos para detecção de HAdV e HBoV por qPCR multiplex (A) e detecção de SaV por qPCR simplex (B)(continua)

A

Adenovirus			
Sonda	Primer	G-Block	Controle positivo
<p><b>Nome:</b> Adp1</p> <p><b>Sequência:</b> 5'- /5HEX/ CCG GGC TCA /ZEN/ GGT ACT CCG AGG CGT CCT /3IABkFQ/- 3'</p> <p><b>Quencher:</b> None</p> <p><b>Fluorescência:</b> HEX</p>	<p><b>AdF</b></p> <p>5'- <u>C</u>WT ACA TGC ACA T<u>C</u>K <u>C</u>SG G - 3'</p> <p><b>AdR</b></p> <p>5'- <u>C</u>RC GGG CRA A<u>T</u>GCA CCA G - 3'</p>	<p><b>SaV, NoVGI, HAdV, AstV</b></p> <p><b>Nº ordem 11401399</b></p> <p>5'- GGC CAT GTT CCG CTG GAT GGC CTT CCA TGA CCT CGG ATT GTG GAC AGG AGA TCG CGA TCT TCT GCC ACA CAC ACC GAA GTA AAT GAT GAT GGC CTC TAA GGA CGC TAC CAA CTA TGA CCA GGC TCT CGC CAC CTA CGA ATC TTG GTT CAT AGG TGG TAC AGG CCT GGT ACA AGG TAG CCC CAG TGA AGA GAC CAC CAA ATT AGT GTT TGA AAT GGA GGG CCT AGG CGA ATT CGC AAT GGT CTT ACA TGC ACA TCG CCG GGC AGG ACG CCT CGG AGT ACC TGA GCC CGG GCC TGG TGC ATT TTG CCC GCG CCA CCG ATA CGT TGA CTC TGG CCT ACC GGC CAG GCT CAC AGA GAG GCA ACT CCA TCG CAT TTG GCG GGG AGG ACC AAA GAA ... - 3'</p>	<p>Registro CI – 018 Lote nº #1239)</p>
Bocavirus			
Sonda	Primer	G-Block	Controle positivo
<p><b>Nome:</b> HBoVP</p> <p><b>Sequência:</b> 5'- 6FAMCCA GAG ATG TTC ACT CGC CGMGBNFQ - 3'</p> <p><b>Quencher:</b> TAMRA</p> <p><b>Fluorescência:</b> FAM</p>	<p><b>HBoV1KF</b></p> <p>5'- CCT ATA TAA GCT GCT GCA CTT C CTG - 3'</p> <p><b>HBoV1KR</b></p> <p>5'- AAG CCA TAG TAG ACT CAC CAC AAG - 3'</p> <p><b>HBoV24KR</b></p> <p>5'- AGC AGA AAA GGC CAT AGT GTC A - 3'</p> <p><b>HBoV234KF</b></p> <p>5'- GCA CTT CCG CAT <u>Y</u>TC GTC AG - 3'</p> <p><b>HBoV3KR</b></p> <p>5'- GTG GAT TGA AAG CCA TAA TTT GA - 3'</p>	<p><b>Aichi, HBoV, NovGIV</b></p> <p><b>Nº Ordem 11496523</b></p> <p>5'- TTA TCT TCC CTG TCT CCA CTG AC CCA ATT GGA CCT GCA CCT CCA GTC CTA CCG CAT ATC CCC TCC CTT TCT CCT TCG TGC GTG CTT ACC CAG ACT CCT CCT GGG CTG CCA TGT ACA ACA CCC ACT CCA TGC CAA AGT TTG AGT CCA TCT ACA AGT GGA TGC GGT TCT CAG ATT TGA GCA CTT GGG AGG GGG ATC GCG ACT TCG CTC CCG ATT TTG TGA ATG AAG ATG GCG TCG AGT GAC GCT GCT CCA TGC ACT TCC GCA TCT CGT CAG CAT GCA TCC GGT CTC CCG CGA GTG AAC ACT TCT GGG AAG AGC TCC ACG CAC GTG GTG AGT GAC ACT ATG GCC TTT TCT GCT CCT GTA ATT A - 3'</p>	<p>Registro CI – 027 Lote nº #1233 Aliquotas 01,02 e 03</p>

Tabela 4 - Relação de insumos para detecção de HAdV e HBoV por qPCR multiplex (A) e detecção de SaV por qPCR simplex (B)(conclusão)

B

Sapovirus			
Sonda	Primer	G-Block	Controle positivo
<p><b>Nomes:</b> SaV124TP e SaV5TP</p> <p><b>Sequência:</b> 5' – CCR CCT ATR AAC CA - MGB-NQF – 3' (SaV124TP)</p> <p>5' – TGC CAC CAA TGT ACC A - MGB-NQF – 3' (SaV5TP)</p> <p><b>Quencher:</b> MGB-NFQ</p> <p><b>Fluorescência:</b> FAM</p>	<p><b>SaV124F</b></p> <p>5' – GAY CAS GCT CTC GCY ACC TAC – 3'</p> <p><b>SaV1F</b></p> <p>5' – TTG GCC CTC GCC ACC TAC – 3'</p> <p><b>SaV5F</b></p> <p>5' – TTT GAA CAA GCT GTG GCA TGC TAC – 3'</p> <p><b>SaV1245R</b></p> <p>5' – CCC TCC ATY TCAAAC ACT A – 3'</p>	<p><b>SaV, NoVGI, AdV, AstrV</b></p> <p><b>Nº ordem 11401399</b></p> <p>5'-GGC CAT GTT CCG CTG GAT CGC CTT CCA TGA CCT CGG ATT GTG GAC AGG AGA TCG CGA TCT TCT GCC ACA CAC ACC GAA GTA AAT GAT GAT GGC CTC TAA GGA CGC TAC CAA CTA TGA CCA GGC TCT CGC CAC CTA CGA ATC TTG GTT CAT AGG TGG TAC AGG CCT GGT ACA AGG TAG CCC CAG TGA AGA GAC CAC CAA ATT AGT GTT TGA AAT GGA GGG CCT AGG CGA ATT CGC AAT GGT CTT ACA TGC ACA TCG CCG GGC AGG ACG CCT CGG AGT ACC TGA GCC CGG GCC TGG TGC AAT TTG CCC GCG CCA CCG ATA CGT TGA CTC TGG CCT ACC GGC CAG GCT CAC AGA GAG GCA ACT CCA TCG CAT TTG GCG GGG AGG ACC AAA GAA ... – 3'</p>	<p>Registro CI – 028 Lote nº #1239 Aliquotas 01,02 e 03</p>

Fonte: (Do autor, 2020).

O desenvolvimento do qPCR multiplex para detecção de HAdV e HBoV foi baseado em um trabalho anteriormente desenvolvido no LVCA (PORTES, 2017). A técnica foi testada primeiro como monoplex para cada vírus individualmente, utilizando amostras já definidas como HAdV e HBoV em um projeto anterior por PORTES (2017), testando também os controles para cada vírus presentes no acervo do LVCA (*non-templatecontrols* – NTC) e as curvas padrão, tudo em duplicatas. A especificidade do teste foi verificada comparando a positividade e os valores de *cycle threshold* ( $C_t$ ) obtidos com os já conhecidos das amostras e curvas. Os *primers* e sondas utilizados para HAdV e HBoV foram respectivamente descritos por HERNHROTH *et al.*,(2002) e KANTOLA *et al.*, (2010). Após a confirmação de que ambos os vírus foram amplificados individualmente, foram unidos em um qPCR multiplex, seguindo os parâmetros descritos a seguir. A sensibilidade do qPCR foi definida usando curvas padrão, constituídas de fragmentos de DNA dupla fita (gBlock® Gene Fragment, Integrated DNA Technologies, Iowa, USA), designados contendo as regiões alvo amplificadas pelos *primers* descritos na tabela acima,

sendo elas as regiões mais conservadas de cada vírus: A primeira parte do gene hexon do HAdV e o genoma do HBoV 1 ao 4 (junção entre as proteínas VP1 e VP2). Uma diluição em série de 10 vezes do gBlock® foi usada para gerar uma curva padrão entre as concentrações padrão do log ( $6 \times 10^7$  a  $6 \times 10^1$  cópias por  $\mu\text{l}$  para HAdV e  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^1$  cópias por  $\mu\text{l}$  para HBoV) seguindo a seguinte fórmula: Número de cópias = Quantidade de DNA  $\times 6022 \times 1023 /$  tamanho do fragmento  $\times 109216 \times 650$ ). O  $C_t$  de cada concentração já é conhecido, tornando possível estimar a carga viral de cada amostra positiva.

Para a amplificação do SaV também foram feitos testes preliminares com NTCs do acervo do LVCA e curvas padrão (descritos na tabela 3), os *primers* e sondas foram usados de acordo com OKA *et al.*, (2006) e tendo novamente a especificidade determinada comparando os  $C_{ts}$  obtidos com os já conhecidos. A região de amplificação usada na curva padrão é a junção da polimerase do capsídio no ORF1, sendo a mais conservada entre as espécies deste vírus.

As reações foram conduzidas de acordo com as recomendações dos fabricantes dos kits, onde o multiplex para detecção de HAdV e HBoV teve os seguintes parâmetros: Etapa de ativação da enzima a  $95^\circ\text{C}$  por 15min, 45 ciclos de amplificação a  $94^\circ\text{C}$  por 1 min e  $60^\circ\text{C}$  por 1 min, já o simplex para detecção de SaV seguiu:

Etapa de transcrição reversa a  $50^\circ\text{C}$  por 30 min, ativação da enzima a  $95^\circ\text{C}$  por 10 min, 40 ciclos amplificação a  $95^\circ$  por 15 seg e  $60^\circ\text{C}$  por 1 min. Foram consideradas amostras positivas as que apresentaram uma curva sigmoide característica, atravessando a linha de *threshold* e apresentando um valor de  $C_t$  até 42,00.

#### **4.7 Amplificação das amostras de saliva e seleção de amostras de fezes e saliva positivas para o sequenciamento**

Para determinar se as amostras detectadas como positivas para HAdV e HBoV teriam carga viral suficiente para serem submetidas ao sequenciamento (seleção de amostras por  $C_t$ ), foram escolhidas para cada vírus 3 amostras com  $C_t$  abaixo de 20, 3 amostras com  $C_t$  entre 20 e 30 e 3 amostras com  $C_t$  acima de 30 e amplificadas com PCR qualitativo de acordo com Allander *et al.*, (2001) para as amostras HAdV positivas e *Nested-PCR* para as amostras HBoV positivas de acordo

com Kapoor *et al.*, (2010), ambos utilizando Platinum® *Taq DNA Polymerase High Fidelity enzyme* (Invitrogen, cat. 11304011).

Foram utilizados os *primers* Hex1deg (*foward*) e Hex2deg (*reverse*) para HAdV, sendo correspondentes a posição 21 a 322 de região codificante do gene hexon, gerando um produto amplificado de 301 pares de base. A reação seguiu os seguintes parâmetros: etapa de ativação da enzima 94°C por 30 seg, seguido de 35 ciclos de denaturação, anelamento e extensão de 94°C por 15 seg., 55°C por 15 seg. e 68°C por 1 min.

Para HBoV, foram utilizados os *primers* AK-VP-F1 (*foward*) e AK-VP-R1 (*reverse*) no primeiro round do Nested-PCR e os *primers* AK-VP-F2 (*foward*) e AK-VP-R2 (*reverse*) no segundo round, sendo eles correspondentes a junção entre as regiões gênicas VP1 e VP2, gerando um produto amplificado de 309 pares de base. Os parâmetros para a reação foram: etapa de ativação da enzima 94°C por 30 seg., seguido de 35 ciclos de denaturação, anelamento e extensão de 94°C por 15 seg., 55°C por 15 seg e 68°C por 1 min no primeiro *round*. Para o segundo *round* foi submetido 2,5 µl de produto amplificado de cada amostra seguindo os parâmetros: ativação da enzima 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de denaturação, anelamento e extensão de 94°C por 15 seg., 55°C por 15 seg. e 68°C por 1 min.

Amostras de saliva respectivas as amostras positivas para HAdV e HBoV selecionadas foram submetidas ao qPCR multiplex para detecção de HAdV e HBoV, seguindo as mesmas especificações usadas para amplificação das amostras de fezes (item 4.6), e posteriormente foram também amplificadas por PCR qualitativo conforme os parâmetros determinados nos parágrafos acima.

As amostras selecionadas de fezes e saliva positivas para HAdV e HBoV que amplificaram no PCR qualitativo foram enviadas a plataforma de sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz. Os parâmetros da amplificação estão descritos no item seguinte.

#### **4.8 Sequenciamento das amostras positivas**

Produtos de PCR obtidos acima a partir de fezes e saliva foram purificados utilizando o kit da promega *Wizard® Sv gel and PCR clean-up system* (ref. A9285, lote 0000303131) e enviadas a plataforma de sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), onde foram sequenciadas através do método de Sanger (SANGER *et*

*al.*, 1977), utilizando os mesmos *primers* que foram usados na amplificação (no caso das amostras HBoV, os *primers* usados no segundo round), utilizando o kit *ABI Prism Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (AppliedBiosystems, cat. 4337454) e o equipamento *ABI Prism 3730 Genetic Analyser* (Applied Biosystems, California, USA).

#### **4.9 Análise das sequências e definição dos genótipos**

Os cromatogramas resultantes das sequências obtidas de cada amostra, de ambos os vírus, foram avaliados usando o programa Chromas 2.4 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia). O genótipo das amostras HAdV e HBoV foi definido usando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do website do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), comparando a similaridade com sequências biológicas revisadas e publicadas na *database* do website. Para construção da árvore filogenética do HBoV e caracterização dos grupos de HAdV, o alinhamento das sequências proveniente das amostras com as sequências de referência foi feito usando o software MEGA - Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version X (KUMAR *et al.*, 2018).

#### **4.10 Detecção do RNA mensageiro do bocavirus humano em amostras genotipadas como HBoV1**

As amostras de fezes e saliva genotipadas como HBoV1 foram testadas para detectar se havia a presença de RNA mensageiro (mRNA). Os ácidos nucleicos de cada amostra foram novamente extraídos e submetidos a digestão enzimática usando a DNase I (Thermo Fisher Scientific, Catálogo nº. EN0521) sem atividade de RNase, de acordo com as especificações do fabricante. Posteriormente as amostras foram submetidas a RT-qPCR usando o kit *SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR 500* (Invitrogen, Catálogo nº 11732020), usando os mesmos *primers* usados no qPCR de detecção. Os parâmetros para o RT-qPCR foram: Ativação da enzima a 95°C durante 10 min e 40 ciclos de denaturação a 95°C durante 15 seg., anelamento e extensão a 60°C por 1 min. Os produtos dessa reação foram

posteriormente submetidos ao qPCR para verificar se ainda havia a presença de DNA residual não digerido.

#### **4.11 Análise estatística**

Foi utilizado o *software StarSoft Statistica 10 Enterprise*, aplicando o teste de Pearson Chi-Square (PEARSON, 1900), onde as diferenças foram consideradas estatisticamente relevantes quando o  $p$  valor foi menor que 0,05, e o cálculo de *odds ratio* (OR) para avaliar se havia diferença significativa entre grupos determinados (SZUMILAS, 2010). Para estimar a precisão do OR, foi considerado um intervalo de confiança de 95%, de forma que foram calculados os intervalos superiores e inferiores de cada OR e considerados significativos os valores cuja subtração entre ambos resultou um valor maior que 0 e menor que 1 (SZUMILAS, 2010).



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Eficiência da técnica de PCR em tempo real para detecção de Adenovirus humano, Bocavirus humano e Sapovirus

Os testes de padronização da PCR quantitativa (qPCR) apresentaram resultados satisfatórios na amplificação das amostras de utilizadas como controle, NTCs e curvas padrão, apresentando os mesmos  $C_{ts}$  já definidos para cada um.

A qPCR multiplex detectou num total de 734 (100%) amostras de fezes, 263 (35,8%) amostras positivas para HAdV e 104 (14,1%) amostras positivas para HBoV, enquanto a PCR simplex detectou 51 (6,9%) amostras positivas para SaV. Os resultados apresentaram os mais diversos níveis de  $C_t$  variando entre 14 a 42. Muitas amostras apresentaram positividade para mais de um vírus simultaneamente.

### 5.2 Frequência de detecção de Adenovirus, Bocavirus e Sapovirus humanos

Os resultados permitem correlação da frequência com alguns fatores selecionados tais como: coinfeção, *status* clínico (com DDA ou IRA) e vacinal, conforme apresentado nas tabelas 4, 5 e 6. O grupo de crianças com DDA foi coletado considerado como “amostra” e o de crianças com IRA, como “controle”.

Na Tabela 4 observa-se que todos os valores calculados de  $p$  para os diferentes vírus investigados - nos dois diferentes grupos - não foram significativos, tendo como base os valores percentuais para ambos os grupos.

A tabela 5 mostra a frequência de HAdV, HBoV e SaV detectados nos grupos de DDA e IRA, em amostras com e sem a presença simultânea de outro vírus. Na Tabela 5A, as frequências detectadas para HAdV variam bastante dependendo do vírus em coinfeção. De acordo com o valor de *odds ratio* e do intervalo de confiança, as diferenças estatisticamente significantes ocorreram apenas por infecção com HAdV e HAdV com coinfeção por HBoV.

A tabela 5B mais uma vez apresenta como significante a coinfeção por HAdV e HBoV, enquanto a tabela 5C não apresenta valores estatisticamente significativos para a infecção por SaV e sua coinfeção com outros vírus.

Tabela 5 - Frequência de Adenovirus (HAdV), Bocavirus (HBoV) e Sapovirus (SaV) detectados nos dois diferentes grupos de crianças analisados, divididos em grupo com doença diarréica aguda (DDA) e infecção respiratória aguda (IRA)

<b>Total de amostras (734)</b>			
	<b>DDA = 485 (100%)</b>	<b>IRA = 249 (100%)</b>	
<b>HAdV</b>	163 (33,6%)	99 (39,8%)	$p^*=0,10081$
<b>HBoV</b>	69 (14,2%)	35 (14,1%)	$p^*= 0,81255$
<b>SaV</b>	35 (7,2%)	17 (6,8%)	$p^*= 0,84530$

Legenda: \* - O valor de significância ( $p$  valor) foi encontrado comparando ambos os grupos de crianças DDA e IRA negativas e positivas para cada vírus através do teste *Pearson Chi-Square* no software *Statistica 10*.

Fonte: (Do autor, 2020).

Tabela 6 - Frequência de Adenovirus (A), Bocavirus (B) e Sapovirus (C) detectados nos grupos de doença diarréica aguda (DDA) e infecção respiratória aguda (IRA) em amostras sem e com a presença de outro vírus simultaneamente (continua)

Adenovírus (A)

<b>Vírus detectados</b>	<b>Total de amostras = 734</b>			
	<b>DDA = 485 (100%)</b>	<b>IRA n= 249 (100%)</b>	<b>OR*</b>	<b>IC*</b>
<b>Apenas HAdV</b>	63 (13%)	41 (16,4%)	0,78	0,67#
<b>HAdV + RVA</b>	20 (4,1%)	13 (5,2%)	0,79	1,23
<b>HAdV + norovirus</b>	39 (8,0%)	17 (6,8%)	1,17	1,47
<b>HAdV + HBoV</b>	5 (1,0%)	11 (4,4%)	0,23	0,59#
<b>HAdV + SaV</b>	1 (0,2%)	0 (0,0%)	0	-

Tabela 7 - Frequência de Adenovirus (A), Bocavirus (B) e Sapovirus (C) detectados nos grupos de doença diarréica aguda (DDA) e infecção respiratória aguda (IRA) em amostras sem e com a presença de outro vírus simultaneamente (conclusão)

Bocavírus (B)

Virus detectados	Total de amostras = 734			
	DDA = 485	IRA n= 249	OR*	IC*
	(100%)	(100%)		
<b>ApenasHBoV</b>	22 (4,5%)	10 (4,0%)	1,13	1,9
<b>HBoV + RVA</b>	0 (0,0%)	2 (0,8%)	0	-
<b>HBoV + norovirus</b>	16 (3,3%)	4 (1,6%)	2,05	5,67
<b>HBoV + HAdV</b>	5 (1,0%)	11 (4,4%)	0,23	0,59#
<b>HBoV + SaV</b>	2 (0,4%)	0 (0,0%)	0	-

Sapovírus (C)

Virus detectados	Total de amostras = 734			
	DDA = 485	IRA n= 249	OR*	IC*
	(100%)	(100%)		
<b>ApenasSaV</b>	8 (1,6%)	3 (1,2%)	1,36	4,82
<b>SaV + RVA</b>	1 (0,2%)	2 (0,8%)	0,25	2,75
<b>SaV + norovirus</b>	9 (1,9%)	3 (1,2%)	1,54	5,32
<b>SaV + HAdV</b>	1 (0,2%)	0 (0,0%)	0	-
<b>SaV + HBoV</b>	2 (0,4%)	0 (0,0%)	0	-

Legenda: \* - Os valores de oddsratio (OR) e os intervalos de confiança (IC) foram calculados de acordo com SZUMILAS (2010). # - Foram considerados estatisticamente significantes os intervalos de confiança menores que 1.

Fonte: (Do autor, ANO).

A tabela 6 apresenta a frequência de infecção por HAdV, HBoV e SaV nos grupos DDA e IRA em crianças vacinadas e não vacinadas com RV1, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos vacinados e não vacinados de acordo com o *p* valor.

Tabela 8 - Positividade para Adenovirus (HAdV), Bocavirus (HBoV) e Sapovirus (SaV) humanos dentro dos grupos de crianças vacinadas e não vacinadas com RV1 nos grupos de amostras de doença diarreica aguda (DDA) e infecção respiratória aguda (IRA)

Total de amostras = 734	Positividade e <i>status</i> de vacinação		
	DDA = 485		
	Vacinados = 192	Não Vacinados = 293	
HAdV	57 (29,6%)	106 (36,1%)	$p^* = 0,13738$
HBoV	30 (15,6%)	37(12,6%)	$p^* = 0,35218$
SaV	16 (8,3%)	19 (6,4%)	$p^* = 0,44477$
	IRA = 249		
	Vacinados = 101	Não Vacinados = 148	
HAdV	45 (44,5%)	54 (36,4%)	$p^* = 0,20215$
HBoV	15 (14,9%)	21 (14,2%)	$p^* = 0,88412$
SaV	7 (6,9%)	10 (6,7%)	$p^* = 0,95742$

Legenda: \* - O valor de significância ( $p$  valor) foi encontrado comparando ambos os grupos de crianças vacinadas e não vacinadas para cada vírus através do teste *Perason Chi-Square* no software Statistica 10.

Fonte: (Do autor, 2020).

### 5.3 Somente amostras com $C_t$ entre 30 e 32 na PCR quantitativa para amplificação de adenovírus humano e bocavirus humanos foram positivas na PCR qualitativa

Os testes de verificação de carga viral das amostras de HAdV e HBoV com a PCR quantitativa revelaram que para ambos os vírus, amostras com o  $C_t$  acima de 32 não amplificaram, gerando o filtro onde apenas amostras positivas com o  $C_t$  até esse limite foram selecionadas, resultando em 36 amostras positivas para HAdV e 27 amostras positivas para HBoV, as quais tiveram suas respectivas amostras de

saliva também amplificadas por PCR quantitativo. As amostras selecionadas foram amplificadas por PCR qualitativa.

Na PCR qualitativa, das 36 amostras de fezes e suas 36 amostras de saliva respectivas selecionadas HAdV, 29 de fezes e de saliva amplificaram. Quanto às 54 amostras HBoV selecionadas (27 de fezes e 27 de saliva), foram amplificadas 22 de fezes e 25 de saliva. Todos esses dados estão apresentados na tabela 7, contendo as amostras selecionadas. As amostras estão representadas com a numeração de identificação utilizada no LVCA. As amostras taxadas de cinza e grifadas são as amostras que amplificaram na PCR qualitativa.

As amostras amplificadas na PCR quantitativa foram enviadas à plataforma de sequenciamento da Fiocruz.

Tabela 9 - Amostras positivas para Adenovirus humano e Bocavirus humano selecionadas. As amostras taxadas de cinza e grifadas foram amplificadas na PCR quantitativa

Amostras HAdV e HBoV selecionadas							
HAdV				HBoV			
Fezes		Saliva		Fezes		Saliva	
<u>26196</u>	<u>27899</u>	<u>26197</u>	<u>27900</u>	<u>26220</u>	27755	<u>26221</u>	<u>27756</u>
26218	<u>27943</u>	26219	27944	<u>26230</u>	<u>27795</u>	26231	<u>27796</u>
26240	<u>28019</u>	<u>26241</u>	28020	<u>26276</u>	<u>27863</u>	<u>26277</u>	<u>27864</u>
26254	<u>28039</u>	26255	<u>28040</u>	<u>26677</u>	<u>27911</u>	<u>26678</u>	<u>27912</u>
<u>26308</u>	<u>28053</u>	26309	28054	<u>26773</u>	<u>27917</u>	<u>26774</u>	<u>27918</u>
<u>26577</u>	<u>28364</u>	<u>26578</u>	28365	<u>27141</u>	<u>27957</u>	<u>27142</u>	27958
<u>26587</u>	<u>28378</u>	26588	28379	<u>27151</u>	<u>28057</u>	<u>27152</u>	<u>28058</u>
<u>26591</u>	<u>28380</u>	26592	28381	<u>27181</u>	<u>28280</u>	<u>27182</u>	<u>28281</u>
<u>26603</u>	<u>28424</u>	26604	28425	<u>27233</u>	28456	<u>27234</u>	<u>28457</u>
<u>26637</u>	<u>28428</u>	26638	28429	<u>27277</u>		<u>27278</u>	
<u>26733</u>	28432	26734	28433	27287		<u>27288</u>	
<u>26769</u>	28462	<u>26770</u>	28463	<u>27293</u>		<u>27294</u>	
<u>27211</u>	<u>28494</u>	27212	<u>28495</u>	<u>27311</u>		<u>27312</u>	
<u>27323</u>	<u>28500</u>	27324	<u>28501</u>	<u>27339</u>		<u>27340</u>	
<u>27701</u>	<u>28502</u>	<u>27702</u>	28503	<u>27377</u>		<u>27378</u>	
<u>27727</u>	28506	27728	28507	27395		<u>27396</u>	
<u>27815</u>	28520	27816	28521	27603		<u>27604</u>	
<u>27847</u>	<u>28536</u>	27848	28537	<u>27753</u>		<u>27754</u>	

Fonte: (Do autor, 2020).

#### **5.4 Variabilidade genética encontrada nas amostras de Adenovirus humano detectadas**

A análise das sequências nucleotídicas obtidas das amostras (fezes e saliva) permitiu verificar que há uma grande variabilidade genética para as amostras de HAdV estudadas, conforme apresentado nas tabelas 8.

Seis amostras não apresentaram qualidade suficiente para que fosse possível a definição do genótipo (amostras 26591, 28053, 28364, 28494, 28495 e 28501) as demais 32 amostras tiveram seu genótipo definido, apresentados na tabela 8A.

14 das amostras sequenciadas possuem coinfeção para um ou mais vírus, sendo o norovirus GII (representado na tabela 8B e 8C como NoVGII) o mais presente, havendo também casos com RVA, HBoV e SaV conforme apresentado na tabela 8B.

Na tabela 8C encontram-se as amostras de fezes e saliva sequenciadas que foram coletadas da mesma criança, permitindo comparativo entre o genótipo encontrado nas fezes e na saliva. Essa tabela também indica se houve detecção de outro vírus na amostra de fezes. Apenas seis amostras de fezes tiveram sua respectiva amostra de saliva também sequenciada, de forma que de 3 amostras, 2 amostras de fezes apresentaram positividade para HBoV e uma para NoVGII. Para melhor visualização, cada par de salivas + fezes de cada criança está representado como criança A, criança B e assim sucessivamente.

A tabela 8D apresenta os genótipos HAdV detectados por grupo, enquanto a figura 12 apresenta a análise comparativa das sequências de aminoácidos deduzidas das amostras HAdV detectadas e amplificadas com amostras do banco de dados do NCBI usadas (referências para cada genótipo caracterizado). Na figura 12A estão as amostras do grupo de crianças com DDA e na 12B com IRA. Na figura 12C foi realizada uma análise evolutiva entre as duas amostras genotipadas como HAdV53 e uma amostra referência detectada em humano na Ásia (Japão). Os dados apresentados nessa figura foram obtidos através do *Software* MEGA-X.

Tabela 10 - Genótipos detectados nas amostras sequenciadas (A), amostras sequenciadas contendo coinfeccção para outros vírus (B), amostras de fezes e saliva sequenciadas pertencentes a mesma criança (C) e divisão das amostras sequenciadas por seus respectivos grupos (continua)

A

<b>Genótipos Adenovirus</b>							
<b>DDA</b>				<b>IRA</b>			
<b>Fezes</b>		<b>Saliva</b>		<b>Fezes</b>		<b>Saliva</b>	
<b>Amostra</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Genótipo</b>
26587	HAdV40	27702	HAdV41	26196	HAdV2	26197	HAdV2
26603	HAdV56	27900	HAdV40	26308	HAdV40	26241	HAdV3
27211	HAdV41			26577	HAdV3	26578	HAdV2
27323	HAdV3			26637	HAdV3	26770	HAdV41
27701	HAdV40			26733	HAdV31	28040	HAdV6
27727	HAdV41			26769	HAdV53		
27815	HAdV40			27943	HAdV40		
27847	HAdV53			28019	HAdV2		
27899	HAdV2			28039	HAdV1		
28378	HAdV41			28380	HAdV41		
28502	HAdV41			28424	HAdV12		
				28428	HAdV12		
				28500	HAdV41		
				28536	HAdV41		

Tabela 11 - Genótipos detectados nas amostras sequenciadas (A), amostras sequenciadas contendo coinfeção para outros vírus (B), amostras de fezes e saliva sequenciadas pertencentes a mesma criança (C) e divisão das amostras sequenciadas por seus respectivos grupos (continuação)

B

Coinfeção das amostras HAdV sequenciadas					
DDA			IRA		
Amostra	Genótipo	Coinfeção	Amostra	Genótipo	Coinfeção
26603	HAdV56	NoVGII(Ct16,76)	26577	HAdV3	HBoV(Ct38,8)
27323	HAdV3	NoVGII(Ct26,06) HBoV(Ct39,02) SaV(Ct16,16)	26733	HAdV31	NoVGII(Ct35,12) SaV(Ct31,14)
27701	HAdV40	RVA(Ct36,40)	26769	HAdV53	HBoV(Ct39,3)
27815	HAdV40	RVA(Ct37,32) HBoV(Ct39,02)	27943	HAdV40	RVA(Ct27,91) HBoV(Ct38,83)
27847	HAdV53	NoVGII(Ct32,83)	28039	HAdV1	NoVGII(Ct24,38)
			28380	HAdV41	NoVGII(Ct13,67)
			28428	HAdV12	RVA(Ct36,76) NoVGII(Ct36,97)
			28536	HAdV41	RVA(Ct36,22) HBoV(Ct17,63)

Tabela 12 - Genótipos detectados nas amostras sequenciadas (A), amostras sequenciadas contendo coinfeção para outros vírus (B), amostras de fezes e saliva sequenciadas pertencentes a mesma criança (C) e divisão das amostras sequenciadas por seus respectivos grupos (conclusão)

C

Fezes e saliva HAdV pareadas DDA			
	Amostra	Genótipo	Coinfeção
Criança A	27701	HAdV40	
	27702	HAdV41	
Criança B	27899	HAdV2	
	27900	HAdV40	
IRA			
	Amostra	Genótipo	Coinfeção
Criança C	26196	HAdV2	
	26197	HAdV2	
Criança D	26577	HAdV3	
	26578	HAdV2	HBoV(Ct38,8)
Criança E	26769	HAdV53	
	26770	HAdV41	HBoV(Ct39,3)
Criança F	28039	HAdV1	
	28040	HAdV6	NoVGII(Ct31,67)

D

Divisão de amostras HAdV por grupo		
Grupo	Tipo de infecção causada	Amostras
A	Gastrentérica	HAdV12: 28424 e 28428 HAdV31: 26733
B1	Respiratória aguda e ocular	HAdV3: 27323, 26577, 26637 e 26241
C	Respiratória aguda e gastrentérica	HAdV1: 28039 HAdV2: 27899, 26196, 28019, 26197 e 26578 HAdV6: 28040
D	Ocular (Ceratoconjuntivite)	HAdV53: 27847 e 2676 HAdV56: 26603
F	Gastrentérica	HAdV40: 26587, 27701, 27815, 27900, 26308 e 27943 HAdV41: 17211, 27727, 28378, 28502, 27702, 28380, 28500, 28536 e 26770

Fonte: (Do autor, 2020).

Figura 12 - Análise comparativa das proteínas geradas pelas sequências nucleotídicas das amostras HAdV positivo e as sequências de referência, comparando grupo doença diarreica aguda (A), infecção respiratória aguda (B) e a relação evolutiva das amostras HAdV53 (continua)

A

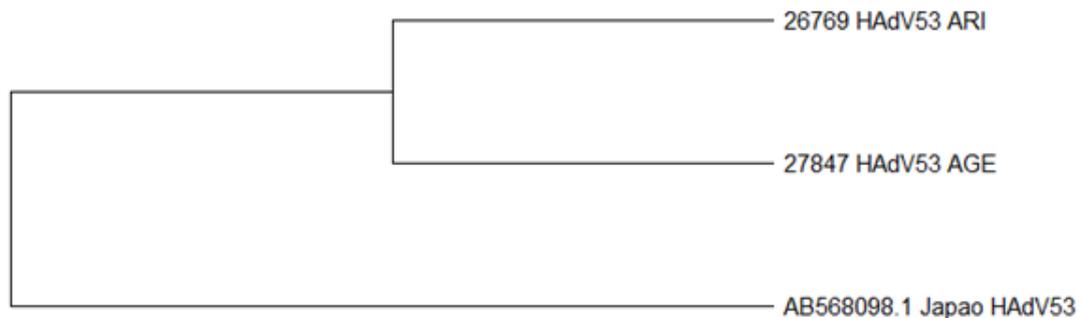
AJ293903.1_Alemanha_HAdV2_Hexon_consenso	ARATETYFSL NNKFRNPVTA PTHDVTIDRS QRLTLRFIPV DREDTAYSYSK ARFTLA [56]
MF177730.1_Rio_de_Janeiro_HAdV2	.....
MH289596.1_Para_HAdV2	.....
27899_HAdV2	.....N.....G.....
MF177751.1_Rio_de_Janeiro_HAdV3	.....D.....MG.....M.....V.....NT.....V.Y.....
MH289593.1_Para_HAdV3	.....D.....MG.....M.....V.....NT.....V.Y.....
27323_HAdV3	.....D.....MG.....H.....M.....V.....NT.....V.Y.....
DQ464895.1_Rio_de_Janeiro_HAdV40	.....D.....G.....V.....E.....V.....
MH289627.1_Para_HAdV40	.....D.....G.....V.....E.....V.....
27815_HAdV40	.....D.....G.....V.....E.....V.....
27701_HAdV40	.....D.....G.....EE.....V.....E.....I.V.....
26587_HAdV40	.....D.....G.....V.....E.....V.....
JN654712.1_Rio_de_Janeiro_HAdV41	.....D.....G.....V.....V.....
MH289623.1_Para_HAdV41	.....D.....G.....V.....V.....
28502_HAdV41	.....D.....G.....A.....V.GYH.....V.....
28378_HAdV41	.....D.....G.....V.....V.....
27727_HAdV41	.....D.....TSF.....V.....V.....
27211_HAdV41	.....D.....G.....V.....H.....V.....
AB568098.1_Japao_HAdV53	.....D.....G.....V.....T.....
27847_HAdV53	P.E.D.....G.....H.A.....P.....V.VPQH.T.....N.....L.....
LC215445.1_Japao_HAdV56	.....D.....G.....V.....T.....
26603_HAdV56	.....D.....G.....HL.....V.....T.....G.....

B

AJ293903.1_Alemanha_HAdV2_Hexon_consenso	ARATETYFSL NNKFRNPVTA PTHDVTIDRS QRLTLRFIPV DREDTAYSYSK ARFTLA [56]
MF177730.1_Rio_de_Janeiro_HAdV2	.....
MH289596.1_Para_HAdV2	.....
26196_HAdV2	.....
28019_HAdV2	.....
MF177732.1_Rio_de_Janeiro_HAdV1	.....
MH289625.1_Para_HAdV1	.....M.....V.....
28039_HAdV1	.....
MF177751.1_Rio_de_Janeiro_HAdV3	.....D.....MG.....M.....V.....NT.....V.Y.....
MH289593.1_Para_HAdV3	.....D.....MG.....M.....V.....NT.....V.Y.....
26577_HAdV3	.....D.....MG.....M.....V.....NT.....V.Y.....
26637_HAdV3	.....D.....MG.....M.....V.....NT.....V.Y.....
KM099407.1_Rio_de_Janeiro_HAdV12	.....D.....T.G.....V.....T.....
MH289617.1_Para_HAdV12	.....D.....T.G.....V.....T.....
28424_HAdV12	.....D.....T.G.....V.....T.....
28428_HAdV12	.....D.....T.G.....V.....T.....
MF177752.1_Rio_de_Janeiro_HAdV31	.....D.....T.G.....V.....
MH289577.1_Para_HAdV31	.....D.....T.G.....V.....
26733_HAdV31	.....D.....T.G.....V.....
DQ464895.1_Rio_de_Janeiro_HAdV40	.....D.....G.....V.....E.....V.....
MH289627.1_Para_HAdV40	.....D.....G.....V.....E.....V.....
26308_HAdV40	.....D.....G.....V.....E.....V.....
27943_HAdV40	.....D.....G.....V.....E.....V.....
JN654712.1_Rio_de_Janeiro_HAdV41	.....D.....G.....V.....V.....
MH289623.1_Para_HAdV41	.....D.....G.....V.....V.....
28380_HAdV41	.....D.....G.....V.....H.....V.....
28500_HAdV41	.....D.....GI.....V.....V.....
28536_HAdV41	.....D.....G.....AG.....V.GI.....V.....
AB568098.1_Japao_HAdV53	.....D.....G.....V.....T.....

Figura 13 - Análise comparativa das proteínas geradas pelas sequências nucleotídicas das amostras HAdV positivo e as sequências de referência, comparando grupo doença diarréica aguda (A), infecção respiratória aguda (B) e a relação evolutiva das amostras HAdV53 (conclusão)

C



AB568098.1_Japao_HAdV53	ARAIDTYFSL	GNQFRNPTVA	PTHDVTIDRS	QRLTLRFVIV	DREDDTYSYK	AREPTLA	[56]
26769_HAdV53_ARI	S.E.....F.	.....K.....	...H.P.AP.	.....	VLHY.....N	.....	.....
27847_HAdV53_AGE	P.E.....	.....	...H...A...	..P.....	VPQH.....N	..L...	.....

Fonte: (Do autor, 2020).

### 5.5 Bocavirus humano do tipo 1 foi predominantemente encontrado nas amostras do grupo doença diarréica aguda, enquanto o tipo 2 no grupo infecção respiratória aguda

Das 22 amostras de fezes e 25 amostras de saliva enviadas para a plataforma de sequenciamento, 18 amostras de fezes e 15 amostras de saliva apresentaram sequencias nucleotídicas com qualidade suficiente para caracterização do genótipo.

No grupo DDA foram 11 amostras de fezes caracterizadas, sendo 10 como HBoV1 e uma como HBoV2, enquanto todas as 11 amostras de saliva pertencentes a este grupo foram caracterizadas como HBoV1. Já no grupo IRA, foram 7 amostras de fezes caracterizadas, 5 como HBoV2, uma como HBoV1 e uma como HBoV3, sendo a única. Com relação às amostras de saliva deste grupo, foram 4 caracterizadas, sendo 3 do grupo HBoV1 e uma HBoV2.

Apenas 3 amostras de fezes não tiveram sua respectiva amostra de saliva caracterizada, e uma amostra de saliva não teve sua respectiva amostra de fezes. Como a maioria das amostras estão pareadas as fezes e saliva respectivas, foi possível separar as amostras por criança, permitindo uma melhor visualização dos resultados. Quanto ao quadro de coinfeção, 4 crianças do grupo DDA e 5 do grupo

IRA possuem um segundo vírus também detectado, sendo em uma criança o SaV e nas demais crianças o HAdV.

Todos os dados descritos acima estão presentes na tabela 9A e 9B, contendo as amostras de DDA e IRA respectivamente. A figura 13 apresenta a árvore filogenética contendo a proximidade evolutiva entre as amostras caracterizadas e as amostras de referência obtidas no banco de dados do NCBI, sendo estas amostras da região Norte e amostras do Rio de Janeiro. A análise da árvore filogenética foi inferida no software MEGA-X usando o método *Maximum Likelihood* e o modelo Tamura-Nei (TAMURA, 1993), onde os valores de *bootstrap* calculados foram acima de 70%, estimado com 2000 pseudo-reproduções de cada nodo.

Tabela 13 - Genótipos de bocavirus humano detectados nas amostras de fezes e saliva sequenciadas, demonstrando também a ocorrência de coinfeção para os grupos de doença diarreica aguda (A) e infecção respiratória aguda (B) (continua)

A

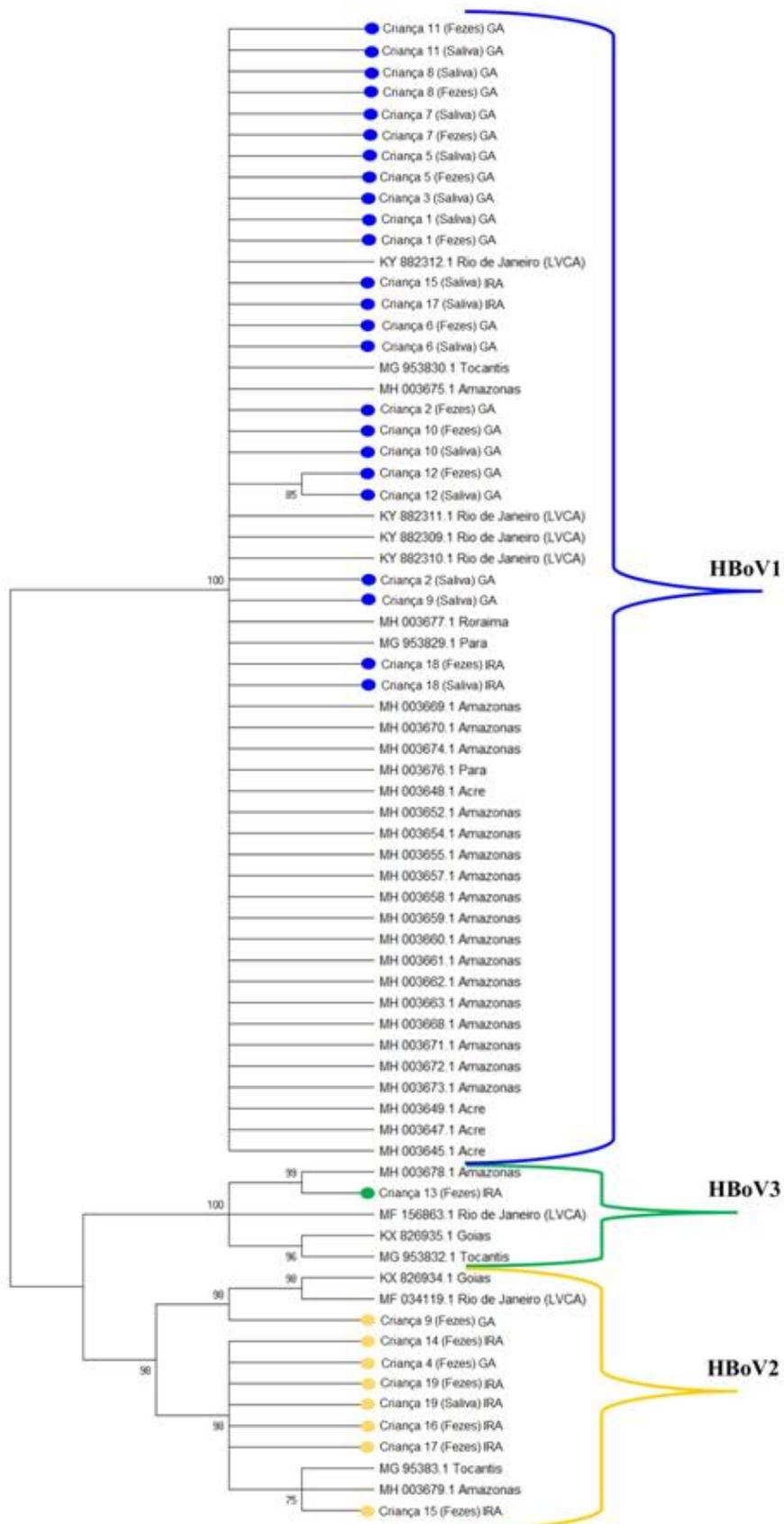
Amostras HBoV Sequenciadas					
Grupo DDA					
	Fezes		Saliva		
Crianças	Amostra	Genótipo	Amostra	Genótipo	Coinfecção
Criança 1	27141	HBoV1	27142	HBoV1	
Criança 2	27181	HBoV1	27182	HBoV1	
Criança 3			27234	HBoV1	
Criança 4	27277	HBoV2			HAdV Ct33,8
Criança 5	27311	HBoV1	27312	HBoV1	
Criança 6	27339	HBoV1	27340	HBoV1	
Criança 7	27377	HBoV1	27378	HBoV1	HAdV Ct39,23
Criança 8	27753	HBoV1	27754	HBoV1	SaV Ct35,21
Criança 9	27795	HBoV2	27796	HBoV1	
Criança 10	27863	HBoV1	27864	HBoV1	
Criança 11	27911	HBoV1	27912	HBoV1	HAdV Ct40,12
Criança 12	28057	HBoV1	28058	HBoV1	

Tabela 14 - Genótipos de bocavirus humano detectados nas amostras de fezes e saliva sequenciadas, demonstrando também a ocorrência de coinfeção para os grupos de doença diarréica aguda (A) e infecção respiratória aguda (B) (conclusão)  
B

<b>Amostras HBoV Sequenciadas</b>					
<b>Grupo IRA</b>					
<b>Crianças</b>	<b>Fezes</b>		<b>Saliva</b>		<b>Coinfecção</b>
	<b>Amostra</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Genótipo</b>	
<b>Criança 13</b>	26220	HBoV3			HAdV Ct36,59
<b>Criança 14</b>	26276	HBoV2			
<b>Criança 15</b>	26677	HBoV2	26678	HBoV1	HAdV Ct36,12
<b>Criança 16</b>	26773	HBoV2			HAdV Ct36,57
<b>Criança 17</b>	27151	HBoV2	27152	HBoV1	
<b>Criança 18</b>	27917	HBoV1	27918	HBoV1	HAdV Ct37,15
<b>Criança 19</b>	28280	HBoV2	280281	HBoV2	HAdV Ct42,91

Fonte: (Do autor, 2020).

Figura 14 - Árvore filogenética demonstrando a proximidade evolutiva entre as amostras caracterizadas e as amostras referência



Fonte: (Do autor, 2020).

## 5.6 RNA Mensageiro detectado apenas em amostras de fezes positivas para bocavirus

Três amostras HBoV1 do grupo DDA amplificaram no teste para detecção de RNA mensageiro, sendo elas, as amostras 27311, 27911 e 28057, conforme apresentado na tabela 10.

Tabela 15 - Amostras HBoV1 do grupo DDA amplificadas no teste para detecção de RNA mensageiro

<b>Amostras HBoV1 amplificadas</b>	
<b>Amostra</b>	<b>Coinfecção</b>
27311	-
27911	HAdV Ct 40,12
28057	-

Fonte: (Do autor, 2020).

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por meio da detecção simultânea de HAdV e HBoV, só foram possíveis devido ao sucesso do método de qPCR padronizado e validado durante este estudo, o qual foi eficiente, apresentou sensibilidade adequada e foi eficaz na detecção destes vírus em amostras de fezes e saliva (LEITÃO *et al.*, 2020). Por serem ambos estes vírus causadores tanto de DDA como de IRA, o método pode ser utilizado no futuro como uma ferramenta eficaz, em centros de referência para a detecção destas duas viroses em crianças acometidas por estas duas enfermidades (DDA e IRA), consideradas as principais causas de mortalidade e morbidade no mundo inteiro em crianças menores de cinco anos. Além de padronizar este qPCR, nosso estudo gerou resultados quanto à frequência destes agentes, e também quanto à frequência dos SaV, considerados agentes emergentes causadores de DDA, em uma população de crianças com quadro clínico de DDA e IRA, conforme discutido a seguir.

As frequências semelhantes detectadas para os HAdV e HBoV nos dois grupos de estudo, sendo de crianças apresentando quadro clínico de DDA e de IRA, poderiam ser explicadas pelo fato de ambos agentes etiológicos virais serem considerados causadores dos dois quadros clínicos (BERK, 2013 e BLINKOVA *et al.*, 2009). No entanto, para os HAdV foi observado uma frequência um pouco mais expressiva no grupo de crianças com IRA do que com DDA. Uma explicação para este fato pode ser a severidade dos HAdV em causar IRA maior do que para DDA. De fato, os HAdV têm sido considerados um importante agente etiológico causador de morbidade e mortalidade por IRA em crianças menores de cinco anos de idade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Não existe nenhum estudo relacionando a infecção pelo SaV com quadro clínico de IRA, somente com DDA, afetando indivíduos de todas as idades e causando epidemias e casos esporádicos de DDA em todo o mundo (OKA *et al.*, 2015). Neste estudo, as frequências detectadas para SaV foram também semelhantes em ambos os grupos de estudo (DDA e IRA), talvez porque estes agentes estejam circulando nas populações sem causar enfermidades, dependendo do perfil de susceptibilidade dos indivíduos distribuídos nas diferentes populações mundiais. A susceptibilidade do hospedeiro para os SaV tem sido investigada. Uma

explicação, fundamentada em achados científicos, é o fato deste vírus causar DDA em alguns indivíduos “susceptíveis” e em outros não (“não susceptíveis”), algo que de forma geral está relacionado a conter algum gene que levaria a expressão de determinada proteína na membrana celular a qual determinado vírus teria afinidade e utilizaria para se acoplar a célula com mais facilidade (MATUSSEK *et al.*, 2015).

A frequência de crianças onde se detectou somente o agente etiológico HAdV foi maior quando comparada com a frequências de crianças coinfectadas com HAdV e RVA. Uma hipótese a ser considerada seria a existência da vacinação por RV1, uma vez que quando comparamos com a coinfeção HAdV e norovirus a frequência para esse novo perfil de coinfeção aumenta novamente. Esse mesmo aspecto também é observado comparando as frequências de HBoV sozinho, HBoV em coinfeção com HAdV e com norovirus. O SaV apresenta frequências baixas, sendo um pouco maiores quando observado sozinho ou acompanhado do norovirus, algo que pode estar relacionado a ambos pertencerem a mesma família e talvez compartilhem um perfil de susceptibilidade para os mesmos hospedeiros.

Durante este estudo o perfil de infecção foi analisado considerando-se também o perfil RVA vacinal das crianças. Crianças não vacinadas apresentando positividade por qPCR para HAdV e com DDA foram em maior número do que vacinadas. No entanto, a detecção de HBoV e SaV foi maior no grupo de crianças RVA vacinadas.

Recentemente, Halasa *et al.*, (2020) realizaram um estudo onde amostras de fezes de crianças entre 15 dias de idade a adolescentes de 17 anos apresentando DDA (2.885 amostras) ou não (1.110 amostras - grupo controle) foram analisadas para a presença dos quatro principais agentes virais causadores de DDA (RVA, norovirus, astrovirus e SaV), considerados de grande importância etiológica (RABONI *et al.*, 2014). No estudo destes autores, a cobertura vacinal para os RVA foi superior a 90%, e foram observadas frequências maiores para respectivamente norovirus, RVA, SaV e astrovirus. O perfil de agentes virais causadores de DDA na era pré-vacina RVA era bem diferente, sendo o RVA o principal causador, seguido pelo Norovirus (BURNETT *et al.*, 2017).

Os norovirus passaram a ser considerados os principais agentes causadores de DDA e outros agentes virais como os SaV emergiram. Nosso estudo também demonstrou a importância das infecções pelos vírus emergentes HBoV e SaV, assim

como mostrou o perfil de infecção dos HAdV, embora numa população com um perfil de cobertura vacinal bem inferior a 90% (dados não mostrados).

As amostras identificadas como HAdV que apresentaram qualidade suficiente para a definição de genótipos foram principalmente obtidas de crianças com IRA. No entanto no grupo de crianças com DDA foi observada uma grande diversidade de genótipos, inclusive genótipos responsáveis por surtos epidêmicos de ceratoconjuntivites na Ásia, como os genótipos HAdV53 e HAdV56 (GONZALEZ, *et al.*, 2019; ADHIKARY; BANIK, 2014). O genótipo HAdV56 nunca foi detectado no Brasil antes. Uma vez que os genótipos HAdV53 e 56 foram detectados separadamente em amostras de crianças com DDA e em co-infecção com norovirus, seria interessante verificar-se em estudos futuros o papel etiológico e real da rota de infecção e disseminação em hospedeiros dos HAdV. No entanto, provavelmente o quadro de DDA apresentado pelas crianças relativas a estas duas amostras foi causado pelos norovirus.

Uma amostra de uma criança com IRA também foi caracterizada genótipo HAdV53, porém em co-infecção com HBoV. Nossa hipótese é de que sendo um genótipo causador de ceratoconjuntivite, provavelmente o quadro de IRA poderia ser ter sido causado pela infecção pelo HBoV conforme será discutido a seguir.

Amostras de crianças com quadro de DDA, sendo HAdV positivas foram caracterizadas como pertencentes aos genótipos HAdV2, HAdV12, HAdV31, HAdV40 e HAdV41, e todos estes genótipos são descritos como causadores de DDA (SCHACHNER *et al.*, 2018). Uma amostra deste grupo de crianças com DDA foi genotipada como HAdV3 em co-infecção com norovirus, HBoV e SaV. A detecção do HAdV3 que é um agente etiológico caracterizado como causador de IRA, em amostras fecais poderia estar relacionado a dualidade da rota de infecção (respiratória e oral-fecal) para vírus causadores tanto de DDA e IRA, que será discutida a seguir com relação aos HBoV e foi apresentada na publicação relacionada aos resultados dessa dissertação (LEITÃO *et al.*, 2020). A mesma situação poderia ser considerada quando foram detectadas tanto em amostras de saliva como em fezes os genótipos HAdV2 e HAdV6, ambos genótipos causadores de IRA.

Por conta da grande variabilidade quanto aos genótipos de HAdV detectados e caracterizados neste estudo, uma árvore filogenética não apresentaria informações satisfatórias, portanto foi realizada uma análise comparativa das

proteínas geradas pelas sequências nucleotídicas obtidas pelo sequenciamento pelo método de Sanger. A análise da sequência proteica gerada pelos diferentes genótipos de HAdV identificados neste estudo, mostrou que as sequências permaneceram conservadas, com poucas alterações de aminoácidos quando comparadas as sequências protótipos selecionadas para esta análise comparativa. Uma exceção foi com relação às amostras genotipadas como HAdV53 e HAdV56 do grupo de crianças com quadro clínico de DDA. A significância destas alterações deverá ser em estudos futuros e de maior complexidade investigada.

Amostras de crianças com quadro clínico de DDA foram preferencialmente genotipadas comparando-se com amostras de crianças com IRA, devido a qualidade dos *amplicons* obtidos, independente de terem sido estes amplificados a partir de amostras de fezes ou saliva. O pareamento de uma amostra de fezes com uma de saliva, pertencente a uma mesma criança, permitiu conclusões com maior grau de confiança.

Noventa e dois por cento (11/12) das amostras de crianças com DDA HBoV positivas foram caracterizadas como genótipo 1 (HBoV1), o qual tem sido caracterizado como principalmente causador de IRA (BROCCOLO *et al.*, 2015). De forma surpreendente também 91% (10/11) destas amostras foram detectadas tanto em fezes como saliva. Além da alta frequência deste genótipo nas amostras de crianças com DDA, alguns fatores nos levaram a acreditar que o HBoV1 é um causador de DDA na população de estudo: 1. Apenas três destas crianças com DDA apresentaram co-infecção com um dos dois vírus causadores de DDA investigados neste estudo (HAdV e SaV) e 2. A carga viral detectadas destes vírus nestas três amostras em co-infecção foram muito baixas.

Estes fatos tornaram forte a nossa hipótese da DDA neste grupo de crianças ter sido causada pelos HBoV1 (Leitão *et al.*, 2020), no entanto, visando reforçar nossa hipótese do HBoV1 ser um causador de DDA, a detecção de mRNA foi realizada e três amostras de crianças com DDA apresentando a confirmação de que estava havendo replicação e *shedding* viral. As amostras HBoV1 do grupo GA foram novamente testadas para detecção de mRNA. Esse teste foi realizado para analisar se o HBoV1 nessas amostras está replicando e causando DDA (consequentemente produzindo mRNA) ou é apenas *shedding* viral sem replicação no trato gastrointestinal. Realmente foi detectado mRNA em três amostras, onde apenas

uma possui coinfeccção com HAdV, porém com uma carga viral muito baixa, evidenciando que o HBoV1 é o provável causador de DDA nas 3 crianças.

No caso dos HBoV, o melhor método para identificar estes agentes como causadores de DDA ou IRA, tem sido a detecção de mRNA, isso porque geralmente a carga viral detectada destes vírus em amostras é baixa, e eles poderiam persistir em tecidos tais como os do trato respiratório, embora causando DDA (IVASKA *et al.*, 2019; CHRISTENSEN *et al.*, 2019). O padrão ouro de detecção deveria ser então a detecção do mRNA, porém em fezes pode ser considerado um desafio, desde que a qualidade deste tipo de amostras não permitiria uma razoável amplificação (devido a presença de enzimas digestivas entre outras). Considerando esta situação, nós podemos levantar a hipótese de que os HBoV1 infectam o trato respiratório, e através das vias respiratórias compartilhadas pelo tubo digestivo, alcançam o trato gastrointestinal, causando DDA (LEITÃO *et al.*, 2020).

Inversamente, para o grupo de crianças com IRA, o genótipo 2 (HBoV2) foi o mais detectado, apesar de ser apresentado na literatura como causador de DDA. Apenas 3 crianças apresentaram o genótipo 1 na saliva, das quais uma também o apresentou nas fezes e as outras duas apresentaram o genótipo 2 nas fezes.

A árvore filogenética construída, onde foram comparadas as sequencias obtidas dos HBoV1, 2 e 3 com as sequencias de amostras do Rio de Janeiro e da região Amazônica disponíveis do GenBank do NCBI, claramente mostrou que todas as amostras HBoV1 se assemelham entre si e com as referências, provavelmente indicando que este genótipo tem circulado e se mantido nesta região causando DDA. Podemos considerar como explicação o fato destes vírus serem de genoma formado por DNA, com pouca pressão evolutiva. No entanto, para os genótipos HBoV2 e HBoV3 detectados neste estudo, os quais têm sido detectados como causadores de DDA na região Amazônica (SOARES *et al.*, 2019), as sequencias de referências foram diferentes das obtidas neste estudo, mostrando uma certa diversidade genética, considerando somente as amostras HBoV2, uma vez que somente uma amostra HBoV3 foi identificada e não permitiu uma melhor análise da diversidade quanto a este genótipo.

No âmbito da vigilância sanitária e saúde pública, os dados vacinais obtidos, conforme avaliação das informações contidas nas fichas epidemiológicas das crianças das quais foram obtidas as amostras, representam uma cobertura vacinal deficiente no estado de RR (dados não apresentados neste estudo). O estado de RR

e regiões adjacentes, que compreendem a região Amazônica, apresentam desafios constantes. Neste estudo, demonstramos a presença de três agentes virais causadores de DDA, sendo dois deles emergentes (HBoV e SaV), demonstrando que além do RVA e Norovírus, há outros vírus causadores de DDA acometendo as crianças da região, portanto, além de um maior investimento nos programas de vacinação RV1, principalmente com atenção à dificuldade logística natural de acesso à região Amazônica, há a necessidade de se manter a vigilância de outros vírus, o que tornaria possível a antecipação de surtos e a tomada de medidas para contenção antes de um aumento do número de casos e mortalidade infantil.

## 7 CONCLUSÃO

Este estudo apresentou resultados com os quais podemos concluir: os HAdV circulam na região Amazônica, considerando-se principalmente o estado de RR, causando DDA e IRA, com uma considerável diversidade de genótipos; os HBoV1 podem ser considerados causadores de DDA em crianças da região Amazônica; existe uma real necessidade de considerar-se outros agentes causadores de DDA como os aqui pesquisados, causando morbidade e mortalidade infantil, principalmente na região Amazônica do Brasil, que apresenta baixa cobertura vacinal e dificuldades naturais. O método de qPCR apresentado neste estudo pode ser uma ferramenta importante para detecção de HAdV e HBoV em amostras de fezes e saliva.

## REFERÊNCIAS

- ADHIKARY, A.; BANIK, U. Human adenovirus type 8: the major agent of epidemic keratoconjunctivitis (EKC). **Journal of Clinical Virology**, v. 61, n. 4, p. 477-486. 2014.
- ALBUQUERQUE, M. *et al.* Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 11, p. 1756, 2007.
- ALLANDER, T. *et al.* Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 36, p. 12891-12896, 2005.
- ALLANDER, T. Human bocavirus. **Journal of clinical virology**, v. 41, n. 1, p. 29-33, 2008.
- ALLARD, A. *et al.* Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 2, p. 498-505, 2001.
- ALCALÁ, A. *et al.* Molecular detection of human enteric viruses circulating among children with acute gastroenteritis in Valencia, Venezuela, before rotavirus vaccine implementation. **Gut pathogens**, v. 10, n. 1, p. 6, 2018.
- AMBERT-BALAY, K. *et al.* Prevalence and genetic diversity of Aichi virus strains in stool samples from community and hospitalized patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1252-1258, 2008.
- ANWARI, P. *et al.* Rotavirus is the leading cause of hospitalizations for severe acute gastroenteritis among Afghan children < 5 years old. **Vaccine**, 2018.
- ARANA, A. *et al.* Genotypes, recombinant forms, and variants of norovirus GII. 4 in Gipuzkoa (Basque Country, Spain), 2009–2012. **PLoS One**, v. 9, n. 6, 2014.
- ARTHUR, J. *et al.* A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000391, 2009.
- BENEDETTI, M. S. G. **Relatório anual de epidemiologia de Roraima 2017**. Roraima: Secretaria de Saúde do Estado de Roraima, 2018.
- BERK, A. J. Adenoviridae. *In*: FIELDS, Bernard N.; KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M. **Fields Virology**. 6.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. v. 1. p. 1704-1731.
- BISHOP, R. *et al.* Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **The Lancet**, Melbourne, v. 302, n. 7841, p. 1281-1283, 1973.

- BLACK, R. *et al.* Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, v. 375, p. 1969–87, 2010.
- BORGESA & CARDOSO, D. Calicivírus Humano. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 10, 2005.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Imunizações: cobertura vacinal 2010-2014**. Brasília DF, 2015.
- BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. **Saúde Brasil 2017: uma análise da situação de saúde e os desafios para o alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. Brasília, DF: MS, 2018.
- BROCCOLO, F. *et al.* Human bocaviruses: Possible etiologic role in respiratory infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 72, p. 75-81. 2015.
- BURNETT, E. *et al.* Global impact of rotavirus vaccination on childhood hospitalizations and mortality from diarrhea. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. 11, p. 1666-1672. 2017.
- CHRISTENSEN, A. *et al.* Human bocaviruses and paediatric infections. **The Lancet Child & Adolescent Health**, 2019.
- DATASUS. **Serviço de Informação ao Cidadão (e-SIC)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em: 07 jan. 2020.
- DE GROOT, R. *et al.* Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. **Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, p. 806-828, 2011.
- DESSELBERGER, U. Rotaviruses. **Virus Research**, Cambridge, p. 75-75, 2014.
- DÓRÓ, R. *et al.* Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? **Infection, genetics and evolution**, v. 28, p. 446-461, 2014.
- EDEN, J. *et al.* Recombination within the pandemic norovirus GII. 4 lineage. **Journal of virology**, v. 87, n. 11, p. 6270-6282, 2013.
- FERREIRA, M. *et al.* Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005–2008. **Journal of medical virology**, v. 82, n. 8, p. 1442-1448, 2010.
- FLEWETT, T.; WOOD G. Therotaviruses. **Archives of Virology**, p. 1-23, 1978.

FLINT, S. Jane *et al.* **Principles of Virology, volume 1: molecular biology.** Washington, DC: ASM Press, 2009.

GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet Infect Dis.** 2017; v. 17, p. 909–48. 2015.

GONZALEZ, G. *et al.* Challenges in management of epidemic keratoconjunctivitis with emerging recombinant human adenoviruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 112, p. 1-9. 2019.

GOYER, M. *et al.* Seroprevalence distribution of Aichi virus among a French population in 2006–2007. **Archives of virology**, v. 153, n. 6, p. 1171-1174, 2008.

GRYTDAL, S. *et al.* Sustained Decline in Acute Gastroenteritis-Associated Hospitalizations and Outpatient Visits Among American Indian/Alaska Native Children After Rotavirus Vaccine Introduction, 2001–2014. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 7, n. 2, p. e37-e39, 2017.

HALASA, N. *et al.* The Changing Landscape of Pediatric Viral Enteropathogens in the Post–Rotavirus Vaccine Era. **Clinical Infectious Diseases**, 2020.

HANSMAN, G. *et al.* Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. **Reviews in medical virology**, v. 17, n. 2, p. 133-141, 2007.

HARDY, M. Norovirus protein structure and function. **FEMS microbiology letters**, v. 253, n. 1, p. 1-8, 2005.

HAY, S. *et al.* Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, Seattle, 2017.

HEMMING, M. Detection of rotateq vaccine-derived, double-reassortant rotavirus in a 7-year-old child with acute gastroenteritis. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 33, n. 6, p. 655-656, 2014.

HEMROTH, B. *et al.* Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 68, n. 9, p. 4523-4533. 2002.

IBGE. **Censo Demográfico 2010: área territorial brasileira.** Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

IBGE. **Pesquisa nacional de saúde 2013: ciclos de vida: Brasil e grandes cidades.** Rio de Janeiro: Brasília, 2011.

IVASKA, L. *et al.* No Correlation Between Nasopharyngeal Human Bocavirus 1 Genome Load and mRNA Detection or Serology in Adeno-/Tonsillectomy Patients. **The Journal of infectious diseases**, v. 220, n. 4, p. 589-593, 2019.

JOHNSEN, C. *et al.* Genetic diversity of sapovirus infections in Danish children 2005-2007. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, p. 265-269, 2009.

JONESTELLER, C. *et al.* Effectiveness of rotavirus vaccination: a systematic review of the first decade of global postlicensure data, 2006–2016. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 5, p. 840-850. 2017.

KANTOLA, K. *et al.* Real-time quantitative PCR detection of four human bocaviruses. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4044-4050, 2010.

KAPOOR, A. *et al.* Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. **The journal of infectious diseases**, v. 201, n. 11, p. 1633-1643, 2010.

KUMAR, K. *et al.* Abstract P-268: Predictors Of Mortality At Admission In Children Admitted To The Intensive Care Unit With Acute Gastroenteritis With Severe Dehydration And Shock. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 19, n. 6S, p. 128-129, 2018.

KUMAR, K. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol. Biol. Evol.**, v. 35, p. 1547-49, 2018.

LEITÃO, G. *et al.* Human bocavirus 1 and 2 genotypes detected in younger Amazonian children with acute gastroenteritis or respiratory infections respectively. **International Journal of Infectious Diseases**, 2020.

LIVELY, J. *et al.* Clinical and Epidemiologic Profiles for Identifying Norovirus in Acute Gastroenteritis Outbreak Investigations. *In: OPEN Forum Infectious Diseases*. US: Oxford University Press, 2018. p. ofy049.

LIU, L. *et al.* Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the sustainable development goals. **Lancet**, v. 388, p. 3027–35. 2016.

MATUSSEK, Andreas *et al.* Molecular characterization and genetic susceptibility of sapovirus in children with diarrhea in Burkina Faso. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 32, p. 396-400, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. (Brasil) **Programa Nacional de Imunizações: 30 anos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

OKA, T. *et al.* Expression of sapovirus virus-like particles in mammalian cells. **Archives of virology**, v. 151, n. 2, p. 399-404, 2006.

OKA, T. *et al.* Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. **J. Med. Virol**, v. 78, p. 1347–1353, 2006.

OKA, T. *et al.* Comprehensive review of human sapoviruses. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 32-53, 2015.

PATTON, J. T. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. **Discovery medicine**, v. 13, n. 68, p. 85, 2012.

PAYNE, D. C. *et al.* Effectiveness of pentavalent and monovalent rotavirus vaccines in concurrent use among US children < 5 years of age, 2009–2011. **Clinical infectious diseases**, Atlanta, v. 57, n. 1, p. 13-20, 2013.

PEARSON, K. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. **PhilosMag Series 5**, v. 50, p. 157-75.1900.

PEREIRA, N. **Uma visão espacial e sociodemográfica da população indígena no Brasil, com base no Censo Demográfico 2010**. 2016.

POP, M. *et al.* Diarrhea in young children from low-income countries leads to large-scale alterations in intestinal microbiota composition. **Genome biology**, v. 15, n. 6, p.R76, 2014.

PORTES, S. *et al.* Enteric viruses in HIV-1 seropositive and HIV-1 seronegative children with diarrheal diseases in Brazil. **PloS one**, v. 12, n. 8, e0183196, 2017.

RABONI, S. *et al.* Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 4, p. 428-435, 2014.

RAMANI, S.; KANG, G. Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. **Current opinion in infectious diseases**, v. 22, n. 5, p. 477-482, 2009.

RODRIGUES, A. **Detecção e caracterização do rotavírus em Aracaju/Sergipe, Brasil, 2010 a 2012**. 2014. 55f. Dissertação (Pós-graduação em Biologia Parasitária) – Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2014.

SANGER, S. *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHACHNER, A. *et al.* Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control—a review on the current global situation. **Avian Pathology**, v. 47, n. 2, p. 111-126, 2018.

SCHLENKER, C. AND SURAWICZ, C. Emerging infections of the gastrointestinal tract. **Best practice & research Clinical gastroenterology**, v. 23, n. 1, p. 89-99, 2009.

SILVA, M. **Rotavírus a genótipos G5 e G1 associados ao genótipo P[8] circulando no Brasil de 1986 a 2013 variabilidade genética pré e pós-vacinação**. 2014. 165f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

SOARES, C. *et al.* Genotyping of enteric adenoviruses by using single-stranded conformation polymorphism analysis and heteroduplex mobility assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1723-1726, 2004.

SOARES, L. *et al.* Molecular epidemiology of human bocavirus in children with acute gastroenteritis from North Region of Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 1233-1239, 2019.

SZUMILAS, M. Explaining odds ratios. **Journal of the Canadian academy of child and adolescent psychiatry**, v. 19, n.3, p. 227, 2010.

TAMURA, K. *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular biology and evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TAMURA, K. *et al.* Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **MolBiolEvol**, v. 10, p. 512-26, 1993.

TEMPORÃO, J. O Programa Nacional de Imunizações (PNI): origens e desenvolvimento. **História, ciências, saúde-manguinhos**, v. 10, p. 601-617, 2003.

TROEGER, C. *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1211-1228, 2018.

VINJÉ, J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 2, p. 373-381, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Top 10 causes of death between 2000 and 2016. **Global Health Observatory data**. Disponível em: [https://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/causes\\_death/top\\_10/en/](https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/). Acesso em: 10 mar. 2020.

ZHENG, D. *et al.* Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology**, v. 346, n. 2, p. 312-323, 2006.