



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

JANE HARUKO LIMA KAIANO

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E MOLECULAR DE
ENTEROPATÓGENOS CAUSADORES DE DIARREIA AGUDA EM CRIANÇAS E
ADULTOS RESIDENTES NA COMUNIDADE QUILOMBOLA DO ABACATAL,
ANANINDEUA, PARÁ.**

BELÉM-PA

2015

JANE HARUKO LIMA KAIANO

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E MOLECULAR DE
ENTEROPATÓGENOS CAUSADORES DE DIARREIA AGUDA EM CRIANÇAS E
ADULTOS RESIDENTES NA COMUNIDADE QUILOMBOLA DO ABACATAL,
ANANINDEUA, PARÁ.**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da
Universidade Federal do Pará como requisito para a
obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Joana D’Arc Pereira
Mascarenhas

BELÉM

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto Evandro Chagas

Kaiano, Jane Haruko Lima

Avaliação epidemiológica, clínica e molecular de enteropatógenos causadores de diarreia aguda em crianças e adultos residentes na comunidade quilombola do Abacatal, Ananindeua, Pará / Jane Haruko Lima Kaiano; orientadora, Joana D'Arc Pereira Mascarenhas. – Belém, 2015.

163 f.: il.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) – Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará.

1. Parasitas intestinais. 2. Rotavirus grupo A e C. 3. Picobirnavírus. 4. Diarreia. 5. Comunidade quilombola. I. Mascarenhas, Joana D'Arc Pereira, orientadora. II. Núcleo de Medicina Tropical. III. Universidade Federal do Pará. IV. Título.

CDD: 616.3427

JANE HARUKO LIMA KAIANO

**AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E MOLECULAR DE
ENTEROPATÓGENOS CAUSADORES DE DIARREIA AGUDA EM CRIANÇAS E
ADULTOS RESIDENTES NA COMUNIDADE QUILOMBOLA DO ABACATAL,
ANANINDEUA, PARÁ.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais.

Banca examinadora:

Membro: Prof^a. Dr^a. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas - Orientadora
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

Membro: Prof^a. Dr^a. Ana Cecília Ribeiro Cruz
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

Membro: Prof^a. Dr^a. Maria Cleonice Aguiar Justino
Instituição: Instituto Evandro Chagas, MS, SVS

Membro: Prof^a. Dr^a. Maisa Silva de Sousa
Instituição: Universidade Federal do Pará, NMT

Membro: Prof^a. Dr^a. Luisa Carício Martins
Instituição: Universidade Federal do Pará, NMT

Prof^a. Dr^a. Maria da Conceição Pinheiro
Membro Suplente – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical

Aprovado em: ____ / ____ / ____

“Há duas formas para viver sua vida.
Uma é acreditar que não existe milagre
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre”

Albert Einstein (1879-1955)

Dedico aos meus pais em especial ao meu pai Deoytsu Kaiano, *in memoriam*, pelo apoio e incentivo para o meu progresso profissional e formação do meu caráter.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À minha orientadora Dra. Joana D'Arc Mascarenhas, por confiar na minha capacidade e auxiliar no meu desenvolvimento intelectual. Agradeço também pela ajuda e compreensão nos momentos mais difíceis. Além de orientadora, a Senhora foi amiga. Serei sempre grata.

Ao Instituto Evandro Chagas, através do Dr. Alexandre Costa Linhares, chefe da Seção de Virologia, pela oportunidade de fazer parte desse grupo e poder dispor do apoio desta instituição para a realização deste trabalho.

À Comunidade Quilombola do Abacatal pela colaboração com a pesquisa e por me receber com carinho e atenção.

A todos da Seção de Virologia pela amizade, carinho e ajuda para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Pará e ao Núcleo de Medicina Tropical em especial a direção, coordenação, secretariado e corpo docente da pós-graduação do NMT pela oportunidade e apoio para realização deste trabalho e desenvolvimento intelectual.

À equipe multidisciplinar que ajudou para a realização do mesmo: Glicélia Aragão, Dra. Consuelo da Silva Oliveira: Dra. Eliete Cunha Araújo, Krynssya Oliveira, Yvone Benchimol Gabbay.

À Darleise de Souza Oliveira pela amizade e análise dos dados do sequenciamento.

À Fernanda Sagica pela amizade e análise estatística dos dados.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À minha família em especial à minha mãe Maria de Lourdes Lima, minha irmã Diana Massuko Lima Kaiano e a minha tia Sra. Olinda Gomes da Silva. Agradeço por hoje estar concluindo mais uma etapa em minha vida e que sem o apoio de vocês talvez não conseguisse chegar onde estou. Muito Obrigada e saibam que Eu Amo Vocês!

A todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos que tentaram direta ou indiretamente prejudicar a realização deste trabalho. Agradeço por me fazer superar todos os obstáculos com força e dignidade e por exercer a prática do amor e tolerância para minha evolução espiritual. Salve Deus!

RESUMO

A doença diarreica aguda é uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil nos países em desenvolvimento e um dos fatores que mais contribui para o agravamento do estado nutricional das crianças. Este estudo objetivou avaliar o perfil clínico, epidemiológico e molecular das infecções por agentes virais e parasitários em crianças na faixa etária de 0 a 10 anos e da comunidade quilombola do Abacatal, no período de 2008 a 2010. Foram colhidas amostras fecais de 294 crianças na faixa etária de 0 a 10 anos e 81 indivíduos acima de 10 anos, residentes na comunidade do Abacatal, Ananindeua, Pará, que apresentaram quadro de diarreia aguda ou sem diarreia (controles). O diagnóstico viral foi realizado pelos testes imunocromatográficos e moleculares e o parasitológico pelo método de Faust e Hoffman. Um total de 375 amostras de fezes foi obtido de 177 indivíduos. As frequências dos agentes virais encontrados no presente estudo foram rotavírus do grupo A, rotavírus do grupo C e picobirnavírus em 6,4% (24/375), 0,3% (1/375) e 1,3% (5/375), respectivamente. A eletroforese em gel de poliacrilamida confirmou a presença de rotavírus A nas 23 amostras com 10 (43,48%) apresentando perfil curto e 13 (56,52%), perfil longo. A presença de enteroparasitas foi observada em 272 (77,94%) amostras, sendo que os mais frequentes foram *Ascaris lumbricoides* detectado em 13,18% (46/349) das amostras, seguido por *Trichuris trichiura* com 10,88% (38/349), ancilostomídeos com 4,01% (14/349) e *Strongyloides stercoralis* 1,72% (6/349). Das 24 amostras positivas para rotavírus do grupo A foram detectados os seguintes genótipos: G2P[4] (12,50%, 3/24); G1P[8] (25,00%, 6/24), G3P[9] (29,20%, 7/24) e G12P[6] (33,33%, 8/24). Foram detectados dois novos genótipos para os genes VP6 (I18) e NSP1 (A19) de rotavírus A. Foi realizada a avaliação nutricional de 38 crianças, demonstrando que 18,4% (7/38) apresentavam-se desnutridas. Este estudo destaca a necessidade de implementar ações de prevenção na comunidade, incluindo medidas de educação para a saúde, a vacinação contra o rotavírus, e até mesmo a implementação de programas para controlar infestações parasitárias.

Palavras-chave: Comunidade Quilombola, parasitos intestinais, rotavírus dos grupos A e C, picobirnavírus, diarreia.

ABSTRAT

Acute diarrheal disease is a major cause of morbidity and mortality in developing countries and one of the factors that contributes to the worsening of the nutritional status of children. This study aimed to evaluate the clinical, epidemiological and molecular profile of infections by viral and parasitic agents in children aged 0-10 years and those over 10 years of quilombo of Abacatal in the 2008-2010 period. Fecal samples from 294 children were collected in the age group 0-10 years and 81 individuals over 10 years, residents of the community Abacatal, Ananindeua, Pará, which had acute diarrhea board or without diarrhea (controls). The viral diagnosis was made by immunochromatographic and molecular tests and parasitological by Faust and Hoffman method. A total of 375 fecal samples were obtained from 177 individuals. The frequency of viral agents in this study were rotavirus group A rotavirus C and picobirnavirus group by 6.4% (24/375), 0.3% (1/375) and 1.3% (5/375), respectively. The polyacrylamide gel electrophoresis confirmed the presence of rotavirus in 23 of 10 samples (43.48%) having short profile of 13 (56.5%) long profile. The presence of intestinal parasites was observed in 272 (77.94%) samples, and the most common were *Ascaris lumbricoides* detected in 13.18% (46/349) of the samples, followed by *Trichuris trichiura* with 10.88% (38 / 349), hookworms with 4.01% (14/349) and *Strongyloides stercoralis* 1.72% (6/349). Of the 24 samples positive for rotavirus group A the following genotypes were detected: G2P [4] (12.50%, 3/24); G1P [8] (25.00%, 6/24), G3P [9] (29.20%, 7/24) and G12P [6] (33.33%, 8/24). Two new genotypes were detected for VP6 genes (I18) and NSP1 (A19) of rotavirus A. Nutritional assessment of 38 children was conducted, showing that 18 4% (7/38) presented malnourished. This study highlights the need to implement preventive actions in the community, including education measures for health, vaccination against rotavirus, and even the implementation of programs to control parasitic infestations.

Keywords: Quilombola Community, intestinal parasites, rotavirus groups A and C, picobirnavirus, diarrhea.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema da partícula de RV com a localização das proteínas.....	24
Figura 2. Demonstração dos 11 segmentos genômicos dos rotavírus e suas respectivas proteínas.....	25
Figura 3. Perfis eletroforéticos do genoma dos grupos de rotavírus de A-G, associados à infecção no homem e outros animais.	26
Figura 4. Representação da estrutura dos genes dos RV.....	30
Figura 5. Constelações genotípicas baseadas no protótipo Wa-like e Human DS-1-like dos RVA.	33
Figura 6. Figura representativa do picobirnavírus demonstrando seus dois segmentos genômicos.	37
Figura 7. Representação esquemática do genoma dsRNA bissegmentado do Picobirnavírus.....	38
Figura 8. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (EGPA) corado por prata mostrando o genoma bissegmentado dos Picobirnavírus.	39
Figura 9. Localização geográfica da Comunidade Quilombola do Abacatal.....	47
Figura 10. Mapa da área geográfica da Comunidade Quilombola do Abacatal.....	48
Figura 11. Estradas de acesso à Comunidade Quilombola do Abacatal.....	49
Figura 12. Características da Comunidade Quilombola do Abacatal.	50
Figura 13. Atividades econômicas da Comunidade Quilombola do Abacatal.....	51
Figura 14. Teste imunocromatográfico para detecção de RVA (RIDAQUICK® Rotavirus).	63
Figura 15. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA) dos agentes virais.	64
Figura 16. Detecção de Picobirnavírus do Genogrupo I por RT-PCR e visualizado em gel de agarose 1,5%, corado por Syber Safe.	65
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose mostrando RT-PCR e Nested-PCR dos genes VP6 e VP7 de RVC corados com Syber Green.	66
Figura 18. Distribuição dos agentes virais na comunidade quilombola do Abacatal entre 2008 a 2010.....	67

Figura 19. Distribuição do estado nutricional nas crianças avaliadas da Comunidade Quilombola do Abacatal, Ananindeua, PA.....	74
Figura 20. Distribuição do estado nutricional de acordo com os indicadores antropométricos: peso/idade, estatura/idade, peso/estatura e IMC/idade nas crianças da Comunidade Quilombola do Abacatal, Ananindeua, PA.	75
Figura 21. Distribuição do estado nutricional de acordo com os indicadores antropométricos: peso/idade, estatura/idade, peso/estatura e IMC/idade em crianças menores e maiores de cinco anos residentes na Comunidade Quilombola do Abacatal, Ananindeua, PA.....	76
Figura 22. Mapa da localização da comunidade quilombola do Abacatal, na região metropolitana do estado do Pará, Ananindeua, Brasil e a distribuição genotípica dos PBV, RVC e RVA.	82
Figura 23. Dendograma baseado na sequencia nucleotídica codificadora completa (1062PB) do gene VP7 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.....	86
Figura 24. Dendograma baseado na sequencia nucleotídica parcial (858pb) do gene VP4 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010. .	87
Figura 25. Dendograma baseado na sequencia nucleotídica parcial (371pb) do gene VP6 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010. .	88
Figura 26. Dendograma baseado na sequencia nucleotídica parcial (653pb) do gene VP1 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010. .	89
Figura 27. Dendograma baseado na sequencia nucleotídica parcial (C1, 662pb; C2,623pb; C3, 647pb) do gene VP2 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.....	90

Figura 28. Dendograma baseado na sequencia nucleotídica parcial (629pb) do gene VP3 de 23 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010. .	91
Figura 29. Dendograma baseado na sequencia nucleotídica completa (1565pb) do gene NSP1 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.....	92
Figura 30. Dendograma baseado na sequencia nucleotídica completa (1038pb) do gene NSP2 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.....	93
Figura 31. Dendograma baseado na sequencia nucleotídica completa (1062pb) do gene NSP3 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.....	94
Figura 32. Dendograma baseado na sequencia nucleotídica completa (738pb) do gene NSP4 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.....	95
Figura 33. Dendograma baseado na sequencia nucleotídica completa (664pb) do gene NSP5 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.....	96
Figura 34. Dendograma de nucleotideos dos novos genotipos A19 e I18 dos genes NSP1 e VP6 de RVA	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Detecção de rotavírus e picobirnavirus em amostras fecais dos grupos diarreicos e não diarreicos na Comunidade Quilombola do Abacatal no período de abril de 2008 a setembro de 2010.	68
Tabela 2. Frequência de infecções parasitárias encontradas nas fezes de crianças e adultos com e sem diarreia da comunidade quilombola do Abacatal.	69
Tabela 3. Frequência dos agentes parasitários encontrados nas fezes de crianças e adultos com e sem diarreia da comunidade quilombola do Abacatal.	70
Tabela 4. Frequência de enteroparasitas em indivíduos diarreicos e não diarreicos por faixa etária na população quilombola do Abacatal no período de abril de 2008 a setembro de 2010.	71
Tabela 5. Associação entre as infecções virais e parasitárias e aspectos clínicos dos pacientes da comunidade quilombola do Abacatal no período de abril de 2008 a setembro de 2010.	72
Tabela 6. Sintomas clínicos das crianças da comunidade quilombola do Abacatal.	73
Tabela 7. Caracterização eletroferética e genotípica dos RVA genótipos G e P detectados em indivíduos com e sem diarreia na comunidade quilombola do Abacatal, no período de 2008 a 2010.	78
Tabela 8. Perfil genotípico dos RVA em associação com a idade e quadro clínico na população quilombola do Abacatal no período de 2008 a 2010.	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Genes de rotavírus com seus respectivos genótipos e funções.....	32
Quadro 2. Segmentos genômicos dos Picobirnavirus com suas respectivas funções e classificações.....	40
Quadro 3. Distribuição das amostras fecais por faixa etária e ano de coleta dos indivíduos residentes da Comunidade Quilombola do Abacatal.....	52
Quadro 4. Reagentes para preparo de gel de poliacrilamida	55
Quadro 5. Reagentes para preparo do tampão de eletroforese.	55
Quadro 6. Lista de iniciadores usados na amplificação dos genes VP6, VP7 dos RVA e Seg 2 PBV.	56
Quadro 7. Sequência de iniciadores usados para a amplificação dos genes estruturais e não estruturais dos rotavírus por RT-PCR.....	58
Quadro 8. Número de amostras coletadas por indivíduos com relação ao quadro clínico, durante o período de 2008 a 2010 na comunidade quilombola do Abacatal.....	61
Quadro 9. Número de amostras coletadas por indivíduos com relação à idade e ao quadro clínico, na comunidade quilombola do Abacatal, durante o período de 2008 a 2010.....	62
Quadro 10. Resultados dos testes RIDAQUICK ® e EGPA das amostras coletadas na comunidade quilombola do Abacatal, durante o período de 2008 a 2010. ...	63
Quadro 11. Relação das residências da comunidade quilombola do Abacatal acometidas por agentes virais durante o período de abril de 2008 a setembro de 2010.....	81
Quadro 12. Resumo dos genótipos de RVA detectados nas amostras sob estudo correspondentes aos 11 segmentos gênicos.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aa – aminoácido
cDNA - DNA complementar
cut off – ponto de corte
DDA - Doença Diarreica Aguda
dsRNA - RNA de fita dupla
EGPA - eletroforese em gel de poliacrilamida
IEC – Instituto Evandro Chagas
kDa- kilo Dalton
MS- Ministério da Saúde
MDDA - Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas
mA - milli-Âmpères
mg – miligrama
mL - mililitro
ng – nanogramas
nm – nanômetros
NSP – Non Viral Protein-Proteína não estrutural
nt - nucleotídeo
ORF - fase aberta de leitura
pb - pares de bases
PBV – Picobirnavirus
RCWG - *Rotavirus Classification Working Group* – Grupo de classificação dos rotavírus
RNAm - RNA mensageiro
RPM - Rotações Por Minuto
RT-PCR - Reação em cadeia mediada pela polimerase, precedida por transcrição Reversa
RV – Rotavírus
RVA – Rotavírus do grupo A
RVC – Rotavírus aviário do grupo C
SG - Subgrupo
SP – Proteínas Estruturais
TA - Temperatura ambiente
TBE - Tampão tris-borato-EDTA
VP – *Viral Protein*-Proteína estrutural

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 DOENÇA DIARREICA AGUDA (DDA).....	20
2.2 PRINCIPAIS AGENTES INFECCIOSOS DA DDA	22
2.2.1 Agentes bacterianos	22
2.2.2 Agentes parasitários	22
2.2.3 Agentes virais	23
2.2.3.1 <i>Rotavírus</i>	23
2.2.3.1.1 Proteínas do rotavírus.....	27
2.2.3.1.1.1 Proteínas Estruturais (VP)	27
2.2.3.1.1.2 Proteínas Não Estruturais (NSP)	28
2.2.3.1.2 Mecanismos de evolução	29
2.2.3.1.3 Classificação	30
2.2.3.1.4 Patogênese e Quadro Clínico	33
2.2.3.1.5 Vacinas contra rotavírus	34
2.2.3.1.6 Epidemiologia	35
2.2.3.2 <i>Picobirnavírus</i>	37
2.3 COMUNIDADE QUILOMBOLA	41
3 JUSTIFICATIVA.....	43
4 OBJETIVOS.....	45
4.1 Objetivo Geral	45
4.2 Objetivos Específicos	45
5 MATERIAL E MÉTODOS	46
5.1 Aspectos éticos	46
5.2 Área de estudo	46
5.3 Espécimes clínicos	52
5.4 Identificação dos agentes virais	53
5.4.1 Suspensão fecal	53
5.4.2 Imunocromatografia	53

5.4.3 Extração do genoma viral	53
5.4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)	54
5.4.5 Amplificação genômica para rotavírus (espécies A e C) e picobirnavírus	56
5.4.6 Sequenciamento dos “amplicons” e análise filogenética dos genes VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP2 NSP3, NSP4 e NSP5.	59
5.5 Identificação dos enteroparasitas	59
5.6 Análise estatística	60
5.7 Dados clínicos e epidemiológicos	60
6 RESULTADOS.....	61
6.1 Detecção dos agentes virais	61
6.2 Detecção dos agentes parasitários	69
6.3 Caracterização genotípica dos 11 segmentos dos Rotavírus do grupo A.....	77
7 DISCUSSÃO	98
7.1 Detecção dos agentes virais	98
7.2 Detecção dos agentes parasitários.....	98
7.3 Aspectos epidemiológicos das infecções virais e parasitárias	99
7.3.1 Aspectos epidemiológicos das infecções virais.....	99
7.3.2 Aspectos epidemiológicos das infecções parasitárias	103
7.4 Aspecto nutricional	105
8 CONCLUSÕES	106
9 BIBLIOGRAFIA	107
ANEXO A – ACEITE DO COMITÊ DE ETÍCA	118
ANEXO B	119
Reagente de extração de genoma viral.....	119
ANEXO C	120
Reagentes da coloração e revelação do genoma viral pela EGPA	120
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	121
APÊNDICE B – FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA	123

APÊNDICE C – ARTIGO SUBMETIDO126

**Prevalence of intestinal enteropathogens in an African-descendant community in Northern Brazil.
.....126**

APÊNDICE D – ARTIGO SUBMETIDO149

**Detection of novel VP6 and NSP1 in rare G3P[9] rotavirus strain in an African-descendant
community, Brazil.149**

1 INTRODUÇÃO

A doença diarreica aguda (DDA) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil nos países em desenvolvimento e um dos fatores que mais contribui para o agravamento do estado nutricional das crianças. Estima-se que a cada ano, em todo o mundo, um bilhão de crianças padeça dessa enfermidade com mortalidade em torno de quatro a cinco milhões de casos (Ciccarelli *et al.*, 2013).

A DDA é uma síndrome causada por diferentes agentes etiológicos que podem ser infecciosos ou não. Os agentes infecciosos são representados por bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonelas*, *Shigella dysenteria* e *Vibrio cholera* e suas toxinas), vírus (rotavírus dos grupos A, B, C e H, norovírus, calicivírus), parasitos (*Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Giardia lamblia*) e toxinas naturais (Brasil, 2009; Ciccarelli *et al.*, 2013).

Os rotavírus se destacam como os principais agentes infecciosos da DDA em todo mundo, sendo responsáveis por elevado índice de internação hospitalar de crianças com sintomas graves de diarreia podendo levar à mortalidade infantil, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (Estes, 2001; Matthijnssens *et al.*, 2011).

No Brasil, os rotavírus são os principais responsáveis pela morbidade e mortalidade de DDA em todo estado nacional, com maior incidência nas regiões Norte e Nordeste (Lanzieri *et al.*, 2011; do Carmo *et al.*, 2011; Linhares e Justino, 2014). Em 2006, o Brasil foi o primeiro país a implantar a vacina contra o rotavírus na América Latina. Linhares e Justino (2014) avaliaram o impacto da vacinação contra o rotavírus e a redução da mortalidade infantil no Brasil e observaram um declínio de casos após a introdução da vacina.

O Ministério da Saúde do Brasil implantou o sistema de Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA) com a principal função de monitorar e prevenir a DDA com políticas de saúde pública nos centros urbanos e áreas sentinelas (Brasil, 2009).

Com a abrangência da MDDA na vigilância de áreas sentinelas, as comunidades quilombolas e ribeirinhas receberam maior atenção das secretarias municipais da saúde

de seus municípios. Algumas comunidades apesar de se localizarem próximas aos centros urbanos são praticamente isoladas devido às condições geográficas que se encontram. As comunidades quilombolas apresentam-se em condições de vulnerabilidade devido ao descaso de políticas públicas e saneamento básico nessas comunidades (Oliveira *et al.*, 2011).

O Estado do Pará foi o primeiro a titular terras de quilombo, em 1997. Entre 1997 e 2003, o Instituto de Terras do Pará (ITERPA, 2009) regularizou 52 terras quilombolas, embora ainda 48 comunidades aguardem a conclusão dos processos de titulação de terras no ITERPA desde 2005 (Oliveira *et al.*, 2011).

A comunidade quilombola do Abacatal, obteve sua titulação em 2 de dezembro de 2008. Está localizada no município de Ananindeua, na região metropolitana de Belém, é constituída de 84 famílias, com uma área de 265,3472 ha, a qual apresenta características rurais com produção de subsistência, falta de saneamento básico e dificuldade de acessibilidade à comunidade o que a torna vulnerável (ITERPA, 2009). A investigação epidemiológica das enteroparasitoses e gastroenterites virais nessa comunidade se faz necessária em razão de uma possível intervenção de tratamento e controle dessas enfermidades.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença Diarreica Aguda (DDA)

A doença diarreica é definida como a passagem de três ou mais evacuações de fezes amolecidas ou líquidas num período de 24 horas e apresenta como quadro clínico: a) A DDA em geral, é autolimitada, com duração de 2 a 14 dias e as formas variam desde as leves até as graves podendo levar a desidratação e distúrbios eletrolíticos, principalmente quando associadas à desnutrição (Ciccarelli *et al.*, 2013). Por ser uma doença autolimitada e de manejo relativamente simples, a correta identificação do tratamento hidroeletrólítico necessário e a manutenção da dieta habitual da criança, poderão evitar mortes e reduzir a morbidade pela doença, enquanto se aguarda que a melhoria das condições socioeconômicas da população possa diminuir a incidência da diarreia infantil. No Brasil, com a disseminação do uso da terapia de reidratação oral, medida que é de baixo custo e eficácia comprovada, se observou que o perfil de mortalidade por diarreia sofreu significativa modificação (Brasil, 2009).

A DDA não é uma doença de notificação compulsória, em virtude de sua elevada frequência. A vigilância é feita pela monitorização dos casos isolados e consiste no registro de dados mínimos dos doentes, tais como residência, idade, plano de tratamento em unidades de saúde. Entretanto, a notificação de surtos de DDA, incluindo os rotavírus, é compulsória e imediata (Brasil, 2008; Brasil, 2010a).

O sistema de Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA) do Ministério da Saúde do Brasil foi criado em 1994. O MDDA é um programa sentinela onde cada programa de vigilância epidemiológica das secretarias municipais da saúde determina a unidade de saúde sentinela. Mais recentemente, tem-se trabalhado no desenvolvimento de vigilância de espaços geográficos delimitados em centros urbanos, que tem sido denominada vigilância de áreas sentinelas (Brasil, 2009).

Com a abrangência da MDDA na vigilância de áreas sentinelas, as comunidades quilombolas e ribeirinhas receberam maior atenção das secretarias municipais da saúde de seus municípios. Algumas comunidades apesar de se localizarem próximas aos centros urbanos são praticamente isoladas devido às condições geográficas que se

encontram. As comunidades quilombolas apresentam-se em condições de vulnerabilidade devido ao descaso de políticas públicas e saneamento básico nessas comunidades (Oliveira *et al.*, 2011).

O modo de transmissão da DDA pode ocorrer pela via oral ou fecal-oral, sendo específico para cada agente etiológico. A transmissão pode ser 1) indireta: com a ingestão de água e alimentos contaminados e contato com objetos contaminados (ex.: utensílios de cozinha, acessórios de banheiros, equipamentos hospitalares); 2) direta: pessoa a pessoa (ex.: mãos contaminadas) e 3) de animais para as pessoas. Os manipuladores de alimentos e vetores como as moscas, formigas e baratas, podem contaminar, principalmente, os alimentos e utensílios, por outro lado, locais de uso coletivo, tais como escolas, creches, hospitais e penitenciárias apresentam maior risco de transmissão (Brasil, 2009, Ciccarelli *et al.*, 2013).

O diagnóstico etiológico da DDA é laboratorial, por meio de exames parasitológicos de fezes, culturas de bactérias e pesquisa de vírus. Tal diagnóstico é importante, principalmente na vigência de surtos visando orientar as medidas de controle. Em casos de surto, deve-se solicitar a orientação da equipe de vigilância epidemiológica do município para a colheita de amostras fecais (Brasil, 2009).

Um surto de DDA é considerado quando há o aumento do número de casos acima do limite esperado para a população envolvida, naquele período específico. A ocorrência de, no mínimo, dois casos com o mesmo quadro clínico após ingestão do mesmo alimento ou água da mesma origem caracteriza-se como surto de doença transmitida por alimento. Para doenças de transmissão hídrica e alimentar considerada rara para a população envolvida, a ocorrência de apenas um caso já é considerada como surto (Brasil, 2009).

O tratamento da DDA consiste na adoção de quatro medidas: 1) correção da desidratação e do desequilíbrio eletrolítico com o uso de solução de sais de reidratação oral e suplemento de zinco como adjuvante; 2) combate à desnutrição; 3) uso adequado de medicamentos específicos quando indicado e 4) prevenção das complicações (Brasil, 2009; Telmenasi, 2010; WHO, 2013).

No caso de infecção por bactérias, a indicação de antibióticos deve ocorrer somente quando o benefício for inquestionável, pois a diarreia aguda, na maioria das

vezes, tem curso autolimitado. Para as diarreias bacterianas podem ser utilizados alguns antibióticos, como aminoglicosídeos, sulfametazol+trimetopim e metronidazol. Não há tratamento para a DDA causada por vírus, apenas utiliza-se tratamento de suporte, como correção da desidratação e do desequilíbrio eletrolítico e tratamento de outros sintomas apresentados, como náuseas e vômitos. Para a DDA causada por parasitos utilizam-se medicamentos como o mebendazol, albendazol e, no caso dos protozoários *G. lamblia* ou *E. hystolitica*, é recomendado o metronidazol, secnidazol e nitazoxanida (Brasil, 2009; Dennehy, 2013).

2.2 Principais agentes infecciosos da DDA

2.2.1 Agentes bacterianos

As doenças intestinais de origem bacterianas caracterizam-se principalmente por diarreia, podendo haver alterações ulceroinflamatórias no intestino delgado ou grosso. Os mecanismos patogênicos das bactérias podem ser de invasão direta da mucosa intestinal, provocando uma resposta inflamatória do hospedeiro; ingestão de toxinas pré-formadas presentes em alimentos contaminados ou a ação toxigênica das toxinas produzidas no lúmen intestinal. Algumas bactérias podem apresentar os dois mecanismos de ação, de invasão e toxigênica (Cotran *et al.*, 2000; Ciccarelli *et al.*, 2013).

As principais bactérias dentre outras causadoras de diarreia são *E. coli* enteroinvasiva, *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia enterocolitica*.

2.2.2 Agentes parasitários

Os parasitos protozoários são microrganismos unicelulares providos de motilidade, membranas plasmáticas complacentes e organelas citoplasmáticas complexas. Alguns protozoários induzem enterite por meio de suas estruturas funcionais associadas à membrana e fatores de virulência que alteram as moléculas celulares hospedeiras e vias de sinalização, levando às lesões estruturais e funcionais

na barreira intestinal (Ciccarelli *et al.*, 2013). Os protozoários *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* são os principais agentes parasitários da DDA.

Muitos helmintos podem causar diarreia e sua importância depende da localização geográfica, condições climáticas, saneamento básico, tratamento de água e a condição imunológica das crianças. Dentre eles destacam-se: *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichiuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*.

2.2.3 Agentes virais

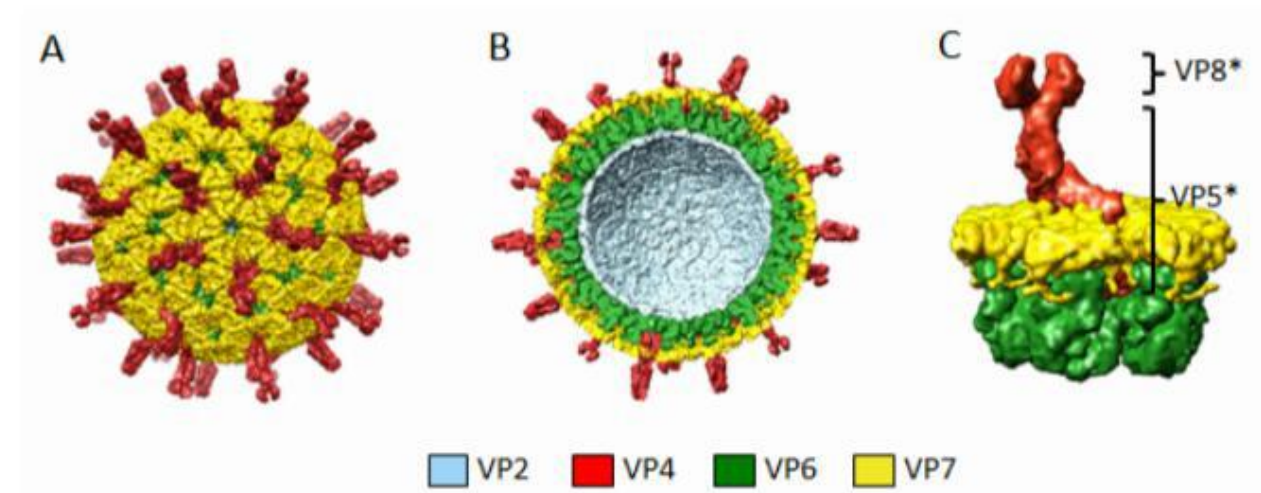
Os vírus são responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de DDA em crianças. As DDA virais são de decorso rápido comparado às ocasionadas por bactérias e quando há uma associação entre elas, o risco de vômito e desidratação é mais elevado em comparação com aquelas sem infecções virais. A gravidade da desidratação é significativamente maior em crianças infectadas tanto com astrovírus quanto com rotavírus do grupo A (Ciccarelli *et al.*; 2013).

Os principais vírus causadores de DDA são os rotavírus do grupo A, B, C; astrovírus, adenovírus entéricos; calicivírus humanos (norovírus e sapovírus). Outros vírus como torovírus, coronavírus e picobirnavírus causam gastroenterites em seres humanos, mas com menor morbidade (Wilhelmi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2013; Linhares *et al.*, 2013).

2.2.3.1 Rotavírus

Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. A partícula viral infecciosa ou virion mede 70 a 100nm de diâmetro, não possui envelope e apresenta simetria icosaédrica com tripla camada proteica concêntrica constituída pelos capsídeos externo, intermediário e interno (Figura 1).

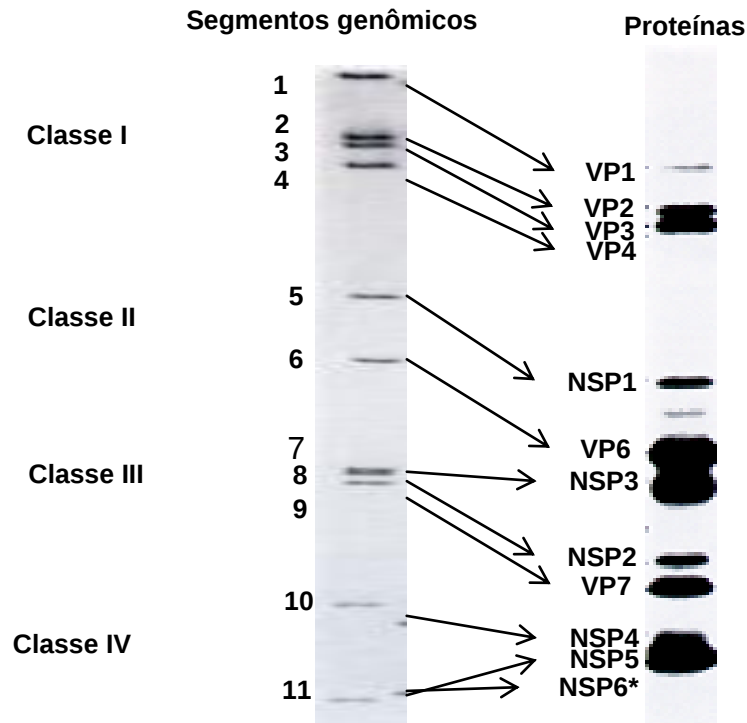
Figura 1. Esquema da partícula de RV com a localização das proteínas.



(A) Tripla camada intacta do vírion com espículas de VP4 (vermelho) projetadas a partir da VP7 no capsídeo externo (amarelo). (B) Corte transversal na partícula viral revelando as três camadas de proteína do vírion: VP2 (azul), VP6 (verde) e VP7 (amarelo). Nota-se que a base das espículas de VP4 se estende até a camada de VP6. (C) Identificação das proteínas VP8* e VP5* na região da proteína VP4 (vermelho). Fonte: Adaptado de Patton, 2012

O core ou capsídeo interno contém em seu interior o genoma viral que é constituído por 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA), os quais variam de 0,6 a 3,3 kilobases, além da enzima transcriptase e das proteínas VP1, VP2 e VP3. Cada segmento genômico regula a síntese de uma proteína viral específica, com exceção do 11^o segmento que sintetiza duas proteínas, a NSP5 e a NSP6. Dessas 12 proteínas seis são estruturais: VP1, VP2, VP3, VP4, VP5 e VP6; e seis não estruturais: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6, de acordo com o demonstrado na Figura 2 (Estes e Greenberg, 2013; Matthijnssens *et al.*, 2011).

Figura 2. Demonstração dos 11 segmentos genômicos dos rotavírus e suas respectivas proteínas.

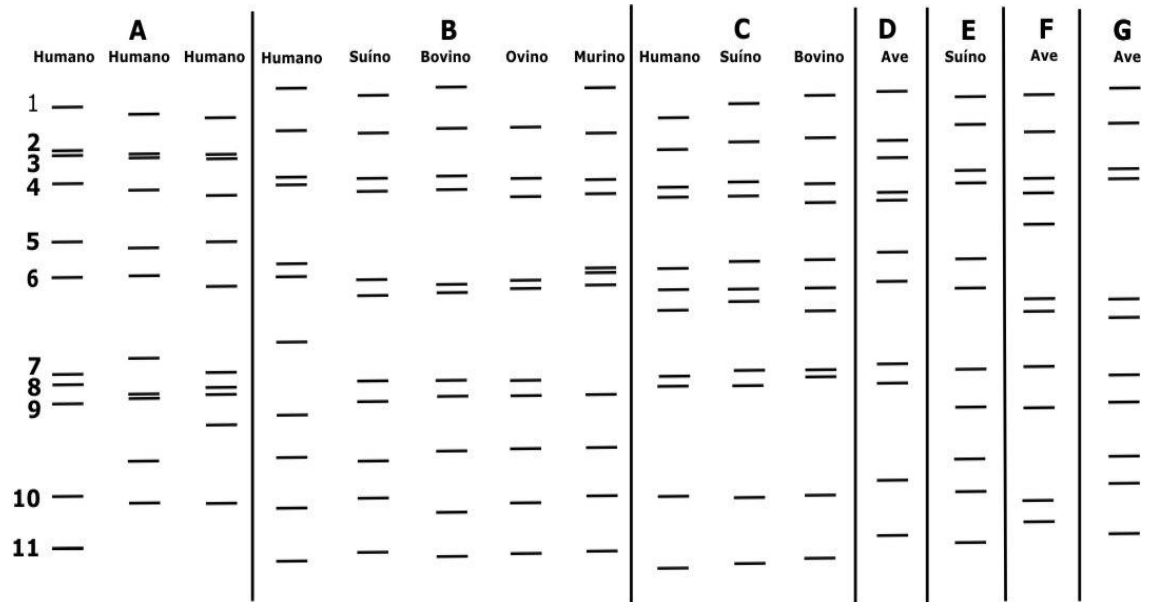


Fonte Adaptado de Desselberger *et al.* (2009)

O capsídeo intermediário é constituído pela proteína VP6, que determina os oito grupos ou espécies de rotavírus designados de A - H. Os rotavírus dos grupos A, B, C e H são importantes patógenos entéricos em seres humanos como em outros mamíferos, enquanto os grupos D, E, F e G foram identificados somente em animais, como demonstra a Figura 3 (Estes e Greenberg, 2013; Matthijnssens *et al.*, 2012; Molinari *et al.*, 2015). Após a infecção, anticorpos anti-VP6 são facilmente detectados e muitos testes diagnósticos são baseados na sensibilidade imunológica dessa proteína. A VP6

apresenta diferentes epitopos que são classificados em subgrupos (SG): SGI, SGII, SGI+II, SG não-I e SG não-II (Estes e Greenberg, 2013; Matthijnsens *et al.*, 2008).

Figura 3. Perfis eletroforéticos do genoma dos grupos de rotavírus de A-G, associados à infecção no homem e outros animais.



Fonte: Adaptada de Kapikian *et al.*, 2001).

O capsídeo externo é formado pelas proteínas VP4 e VP7, que por serem as mais externas induzem a resposta imune do hospedeiro na produção de anticorpos neutralizantes. A proteína VP4 determina o genótipo P (sensível à protease) e a VP7 o genótipo G (G de Glicoproteína) (Estes, 2001; Matthijnsens *et al.*, 2008). A proteína VP4 sofre clivagem por proteases do tipo tripsina produzindo dois polipeptídeos, VP8* e VP5* que induzem independentemente a formação de anticorpos neutralizantes conforme demonstrado na Figura 1C (Settembre *et al.*, 2011).

2.2.3.1.1 Proteínas do rotavírus

2.2.3.1.1.1 Proteínas Estruturais (VP)

A proteína VP1, codificada pelo segmento 1 do dsRNA, é constituinte do core viral e integrante do complexo de replicação viral juntamente com a proteína VP3, atuando como uma RNA polimerase RNA dependente. Entre as proteínas do core é a única que possui uma sequência específica de reconhecimento ao RNA viral (Li *et al.*, 2009; Mertens, 2004).

A proteína VP2 (segmento 2) é a proteína que recobre o capsídeo interno, interagindo com o RNA viral e atuando no processo de replicação viral devido a sua capacidade de ligar-se ao dsRNA por meio de seus resíduos N-terminais (Jayaram *et al.*, 2004).

A proteína VP3 (segmento 3) possui atividade metiltransferase, guaniltransferase e participa do processo de transcrição viral juntamente com a proteína VP1, ligando-se ao RNA de fita simples (Li *et al.*, 2009).

A proteína VP4 (segmento 4) é composta por 776 aminoácidos, não é glicosilada e forma 60 projeções a partir do capsídeo externo de partículas virais maduras (Shaw e Hempson, 1996; Yeager *et al.*, 1994). É uma hemaglutinina e sofre clivagem proteolítica por ação da tripsina, resultando na formação dos peptídeos VP5* (60 kDa, aa 248-776) e VP8* (28 kDa, aa 1-247), proporcionando o aumento da infectividade viral e a entrada do vírus na célula (Estes e Greenberg, 2013).

A proteína VP6 (segmento 6) compõe o capsídeo intermediário, sendo a proteína mais abundante do vírion e principal portadora dos determinantes antigênicos que permitem classificar os rotavírus em diferentes grupos e subgrupos. Essa proteína exerce um papel importante na estrutura da partícula viral devido à interação com as proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7) e interno (VP2). Está envolvida nas duas principais funções do vírus que são o processo de entrada na célula hospedeira e transcrição do dsRNA (Estes e Greenberg, 2013).

A VP7 é uma glicoproteína do capsídeo externo capaz de induzir a síntese de anticorpos neutralizantes, sendo sintetizada pelo segmento 7, 8 ou 9 dependendo da amostra viral (Greenberg *et al.*, 1983; Mattion *et al.*, 1994). A proteína VP7 interage com a VP4 durante o processo de aderência e penetração, podendo também atuar com as moléculas da superfície celular do hospedeiro, após a adsorção (Estes e Greenberg, 2013; Jayaran *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2009).

2.2.3.1.1.2 Proteínas Não Estruturais (NSP)

A proteína NSP1, codificada pelo segmento 5, apresenta associações com o citoesqueleto celular favorecendo a ligação do vírus à célula. É a proteína viral menos conservada, mostrando maior variabilidade de sequência do que VP4 e VP7. Possui domínios relativamente conservados (*zinc finger*), porém não se encontram presentes em todas as variantes, mostrando não ser uma proteína essencial à replicação viral (Estes e Greenberg, 2013; Mertens, 2004).

A NSP2 (segmento 8) tem atividade de NTPase e helicase. Se expressa em altos níveis em células infectadas e está localizada nos viroplasmas (sítio de montagem das partículas virais no citoplasma). Sua associação com a NSP5 faz com que essas duas proteínas estejam envolvidas na replicação e encapsidação do RNA (Estes e Kapikian, 2007; Jayaram *et al.*, 2004; Taraporewala *et al.*, 1999; Taraporewala e Patton, 2001).

A proteína NSP3, codificada pelo segmento 7, está envolvida na regulação da tradução. Tem conformação de um homodímero que reconhece a sequência consenso 3' do RNA mensageiro (RNAm), o que favorece a tradução dos transcritos de RNAm nos ribossomos e ainda previne a degradação dos mesmos por nucleases celulares (Jayaram *et al.*, 2004).

A NSP4 (segmento 10) é uma glicoproteína transmembrana com significativo papel na morfogênese e patogênese viral (Estes, 2001; Jagannath *et al.*, 2006). Experimentos em modelos murinos demonstraram que esta proteína apresenta uma potente ação enterotóxica desencadeando o efluxo de íons Cl^- e a entrada de água para o lúmen intestinal, levando um quadro diarreico de natureza secretora (Ball *et al.*, 1996; Estes, 2001, Huang *et al.*, 2004).

A proteína NSP5, codificada pelo segmento 11, possui atividade de autoquinase e em células infectadas apresenta formas hipo e hiper fosforiladas (Taraporewala et.al., 2004). Quando a NSP5 é expressa em células não infectadas, a NSP2 induz a hiper fosforilação de NSP5, mostrando a interação dessas duas proteínas. Durante o processo de replicação a NSP2, NSP5 e NSP6 estão associadas na formação de viroplasmas (Estes, 2001).

2.2.3.1.2 Mecanismos de evolução

O genoma viral é constituído por 11 segmentos de dsRNA com padrões distintos para o grupo/espécie de rotavírus. A fita positiva dos segmentos genômicos tem uma estrutura semelhante, e possui na sua extremidade uma sequência 5'-guanidina seguida de uma sequência conservada que faz parte da região 5' não-codificante. Cada um dos segmentos de dsRNA possui uma fase de leitura aberta (ORF) para codificação da proteína, seguida por um códon de finalização e outra região não codificadora, situada na extremidade 3', que é finalizada com 3'-citidina terminal conforme demonstrado na Figura 4 (Estes e Kapikian, 2007). Os onze segmentos de RNA têm sequências de nucleotídeo terminal 5' e 3' extremamente conservadas: 5'-GGC...ACC-3' (Desselbeger, 2014).

Figura 4. Representação da estrutura dos genes dos RV.



Fonte: Adaptado de Estes (2001).

O mecanismo de evolução e manutenção dos rotavírus se dá pela variabilidade genética que o seu genoma apresenta. Diferentes mecanismos contribuem para sua evolução tais como: mutações pontuais frequentes em todos os segmentos de RNA; reestruturação do genoma que ocorre em células e organismos individuais duplamente infectados *in vivo* e muitas vezes envolvidos na transmissão zoonótica, havendo troca de segmentos e rearranjos genômicos, consistindo de duplicações parciais ou deleções de sequências de nucleotídeos de segmentos individuais (Desselberger, 2014). Contudo, os principais mecanismos de evolução parecem ser as mutações pontuais que ocorrem continuamente devido à elevada taxa de erro da RNA polimerase RNA-dependente (VP1) do rotavírus (Blackhall *et al.*, 1996) e a reestruturação genômica.

2.2.3.1.3 Classificação

Os rotavírus são classificados com base na composição antigênica da sua estrutura. De acordo com a diferença de massa molecular de cada segmento de RNA, eles podem ser agrupados e classificados em quatro classes, quando submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA): classe I (segmentos 1, 2, 3 e 4), classe II

(segmentos 5 e 6), classe III (segmentos 7, 8 e 9) e classe IV (segmentos 10 e 11); como demonstrado na Figura 2. Com base na velocidade de migração do 10º e 11º segmentos que determinam o perfil longo (migração rápida), perfil curto (lenta) e perfil super curto (super lenta) (Estes e Kapikian, 2007).

A classificação sorotipo/genótipo dos rotavírus baseia-se na combinação binária dos genótipos G e P. Atualmente, foram caracterizados 27 genótipos G (G1-G27) e pelo menos 37 genótipos P (Matthijnssens *et al.*, 2011; Trojnar *et al.*, 2013). A determinação dos sorotipos se fundamenta no uso de anticorpos monoclonais específicos (MAbs) e teste de neutralização, enquanto que a dos genótipos é feita a partir de técnicas de biologia molecular, incluindo o sequenciamento nucleotídico e análise filogenética das amostras (Estes, 2001; Matthijnssens *et al.*, 2011).

Algumas combinações binárias demonstram ser importantes epidemiologicamente, tais como G1P[8], G3P[8], G4P[8], G2P[4] e G9P[8], e mais recentemente G12P[8] e G12P[6] (Desselberger, 2014; Santos e Hoshino, 2005).

Matthijnssens *et al.* (2008) propuseram um novo sistema de classificação dos rotavírus baseado na identificação nucleotídica dos 11 segmentos genômicos. Assim sendo, foi formado um grupo de trabalho para classificação dos rotavírus (*Rotavirus Classification Working Group* – RCWG) composto por virologistas especialistas em biologia molecular, doenças infecciosas, epidemiologia e em saúde pública. O RCWG tem como função analisar e designar novos genótipos das sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados, mantendo ainda, a colaboração com o grupo do Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (*Study Group Reoviridae of the International Committee on Taxonomy of Virus*).

A nova nomenclatura proposta para os rotavírus se baseia na identificação nucleotídica dos 11 segmentos genômicos e é designada por Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x=número arábico indicando o número do genótipo), o que representa os genótipos dos respectíveis genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 (Matthijnssens *et al.*, 2008).

O RCWG já identificou 52 novos genótipos após sua criação. Até setembro de 2012 já foram identificados novos genótipos para VP7 (G20-G27), VP4 (P[28]-P[37]), VP6 (I12-I17), VP1 (R5-R9), VP2 (C6-C9), VP3 (M7-M8), NSP1 (A15-A18), NSP2 (N6-

N10), NSP3 (T8-T12), NSP4 (E12-E15) e NSP5/6 (H7-H11) (Matthijssens *et al*, 2011; Papp *et al.*, 2012). Com o aumento do número de sequências do genoma completo para ser avaliado, fez-se necessária a padronização do sistema de nomenclatura para cada sequência depositada de rotavírus. A identificação das sequências é nomeada individualmente por RV grupo/espécie de origem/país de identificação/nome comum/ano de identificação/tipo G e P, como, por exemplo, para o protótipo “Wa”: RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P[8] (Matthijssens *et al*, 2011).

O Quadro 1 resume as principais funções que as proteínas desempenham na morfologia e patogênese do rotavírus, bem como os genótipos descritos até o presente.

Quadro 1. Genes de rotavírus com seus respectivos genótipos e funções.

Gene	Segmento	Genótipo	Função da proteína
VP1	1	9R	RNA polimerase – RNA dependente
VP2	2	9C	Proteína do Core
VP3	3	8M	Metiltransferase
VP4	4	37P	Sensível a Protease
VP6	6	17I	Capsídeo Interno
VP7	9	27G	Glicoproteína
NSP1	5	18A	Antagonista do Interferon
NSP2	8	10N	NTPase
NSP3	7	12T	Intensificador da Tradução
NSP4	10	14E	Enterotoxina
NSP5/NSP6	11	11H	Fosfoproteína (<i>pHosphoprotein</i>)

Com a classificação dos 11 segmentos genômicos foi necessário o agrupamento dessas sequências com os grupos dos seis protótipos Wa-like, DS-1-like, Wa-like x DS-1-like, AU-1-like, Wa-like x bovino e vacinal, formando assim a constelação gênica (Matthijssens e Van Ranst, 2012) (Figura 5).

Figura 5. Constelações genotípicas baseadas no protótipo Wa-like e Human DS-1-like dos RVA.

Amostras		Constelação	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	N
A	RVA/Human-tc/USA/Wa/1974/G1P1A[8]	Wa-like	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	179
	RVA/Human-tc/USA/P/1974/G3P1A[8]		G3	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	81
	RVA/Human-wt/USA/DC5115-Bethesda/1977/G4P[8]		G4	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	11
	RVA/Human-wt/BEL/B3458/2003/G9P[8]		G9	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	28
	RVA/Human-tc/BRA/IAL28/1992/G5P[8]		G5	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	1
	RVA/Human-wt/CIV/6736/2004/G8P[8]		G8	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	5
	RVA/Human-wt/NGA/6717ARN/2002/G10P[8]		G10	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	4
	RVA/Human-wt/BGD/Matlab36/2002/G11P[8]		G11	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	1
	RVA/Human-wt/BEL/B4633/2003/G12P[8]		G12	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	7
	RVA/Human-tc/AUS/RV3/1977/G3P[6]		G3	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	1
	RVA/Human-tc/GBR/ST3/1975/G4P2A[6]		G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	1
	RVA/Human-wt/CAM/6782/2000/G8P[6]		G8	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	1
	RVA/Human-wt/BGD/Dhaka12/2003/G12P[6]		G12	P[6]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1	6
B	RVA/Human-tc/USA/DS-1/1976/G2P1B[4]	Human DS-1-like	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	10
	RVA/Human-wt/DEU/GER1H/2009/G8P[4]		G8	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	2
	RVA/Human-wt/USA/06-242/2006/G2P[6]		G2	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	1
	RVA/Human-wt/BEL/F01322/2009/G3P[6]		G3	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	2
	RVA/Human-wt/BEL/B1711/2002/G6P[6]		G6	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	1
	RVA/Human-wt/COD/DRC86/2003/G8P[6]		G8	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	1
	RVA/Human-wt/ZAF/GR10924/1999/G9P[6]		G9	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2	1

Adaptado de Matthinssens e Van Ranst (2012).

2.2.3.1.4 Patogênese e Quadro Clínico

Os rotavírus infectam usualmente os enterócitos maduros das vilosidades do intestino delgado. Contudo, já foram reportados em sítios extraintestinal, incluindo trato respiratório, fígado, rim, linfonodos e sistema nervoso central (Dennehy, 2008; Ruiz *et al.*, 2009). A fisiopatologia da doença diarreica causada por rotavírus é multifatorial, onde mudança na homeostase iônica leva a disfunção dos enterócitos, aumentando a secreção, alterando a motilidade, morte celular e redução da absorção da superfície intestinal, portanto a má absorção (Ruiz *et al.*, 2009).

Apresentam como quadro clínico a tríade clássica: febre, diarreia e vômito. A forma assintomática é mais frequente em adultos, além de neonatos e crianças até seis meses de idade. A transmissão ocorre via fecal/oral, por meio de água e superfície

ambiental contaminada e uma possível transmissão via respiratória em modelo animal (Gray *et al*, 2008; Levy *et al*, 2009; Okoh *et al*, 2010, Prince *et al*, 1986).

O período de incubação varia de um a dois dias e o quadro clínico persiste em quatro a sete dias (Desselberger *et al.*, 2009). Estas manifestações clínicas em conjunto levam a um quadro grave de desidratação e desequilíbrio eletrolítico, principalmente quando associadas à desnutrição. Os casos mais graves, quando não tratados adequadamente, podem ocasionar o óbito. Infecções secundárias por rotavírus são clinicamente moderadas ou assintomáticas (Gray *et al.*, 2008).

2.2.3.1.5 Vacinas contra rotavírus

A primeira vacina desenvolvida no mundo contra os rotavírus foi a Rotashield® produzida pela Wyeth Lederle Vaccines. Essa vacina foi licenciada nos Estados Unidos da América em 1988. O esquema de vacinação consistia na aplicação de três doses aos 2, 4 e 6 meses de idade. Contudo, teve sua comercialização suspensa em 1999 em decorrência de sua possível associação com o aumento do número de casos de intussuscepção, ou seja, um evento raro de invaginação da alça intestinal ocasionando obstrução intestinal em crianças. Esta vacina era do tipo oral, atenuada e tetravalente, com rearranjo símio e humano, composta pelos tipos G1, G2, G3 e G4 (Lynch, 2006; Dennehy, 2008, WHO, 2014).

A partir de então, a OMS envidou esforços no sentido de apoiar estudos com outras vacinas e que fossem realizados concomitantemente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, com especial ênfase para observar casos de intussuscepção. Atualmente duas vacinas orais encontram-se disponíveis comercialmente: Rotarix® (GSK Biologicals, Bélgica) e RotaTeq® (Merck, USA) (O’Ryan e Linhares, 2009; Dennehy, 2008). A vacina Rotarix® foi produzida em 2000 e licenciada em 2005. Ela é uma vacina oral, atenuada, monovalente de origem humana (G1P[8], cepa RIX4414), com esquema de administração em duas doses aos 2 e 4 meses de idade, com intervalo mínimo entre as duas doses de 4 semanas. Apresenta elevada imunogenicidade, eficácia e segurança (WHO, 2014; Desselberger, 2014).

A vacina RotaTeqTM foi licenciada em 2006. Ela é uma vacina oral, atenuada, pentavalente, com rearranjo humano-bovino, contendo os rearranjos de rotavírus G1, G2, G3, G4 e P1A (genótipo P[8]), aqui denominado como P1[8]. Apresenta elevada proteção contra as formas graves de diarreia, sendo administrada por via oral em três doses, para bebês entre 6 e 32 semanas de idade. A primeira dose desta vacina é administrada entre 6 e 12 semanas de idade com intervalo mínimo de 4 semanas entre as doses (WHO, 2014, Desselberger, 2014).

Além disso, várias vacinas alternativas estão sendo desenvolvidas com vírus atenuados, partícula viral inativada, partículas semelhantes ao vírus (*virus-like particles*-VLPs) expressas em Baculovírus recombinantes de células de insetos infectados ou em levedura e vacina de DNA (Desselberger, 2014).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza o uso mundialmente das vacinas RotaTeqTM e RotarixTM por apresentarem baixo risco de intussuscepção (Desselberger, 2014).

Dentre os países que adotaram a Rotarix[®], o Brasil foi o primeiro país da América Latina a incluir este imunizante com a denominação de Vacina Oral de Rotavírus Humano (VOHR) em 2006 no calendário de vacinação do Programa Nacional de Imunização (PNI) do governo nacional. Araújo *et al.* (2007) demonstraram em ensaios clínicos de fase II que a vacina RotarixTM apresentou proteção imunológica contra o rotavírus com elevada imunogenicidade e baixa reatogenicidade, e não interferiu na resposta sérica a outros antígenos vacinais concomitantemente administrado. Linhares e Justino (2014) demonstraram ainda a efetividade desta vacina durante os sete anos da introdução da Rotarix[®] no PNI do Brasil com redução das taxas de internações e óbito de crianças menores de um ano de idade.

2.2.3.1.6 Epidemiologia

Os rotavírus são bem resistentes às condições ambientais (Desselberger *et al*, 2009, Okoh *et al*, 2010) e são responsáveis pela maioria dos casos de gastroenterite na população infantil alcançando 31% dos casos se comparado aos Norovírus,

Calicivirus e *Escherichia coli*, e ocasionando cerca de 197 mil óbitos anualmente (Moraes e Castro, 2012; Lanata et al., 2013).

No Brasil, por meio do programa de Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas do Ministério da Saúde, foram registrados quase 1 milhão e 200 mil casos de diarreia entre menores de 5 anos em 2004 (Brasil, 2006). As frequências de gastroenterites observadas no Brasil variaram de 12 a 42% entre crianças menores de 6 anos e uma prevalência de 36,5% na região norte (Linhares, 2000). Com a implantação do sistema de imunização contra o RV, observou-se um declínio de casos de mortalidade e morbidade infantil com DDA causada pela rotavirose (do Carmo et al., 2011; Lanzieri et al., 2011).

Os genótipos G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8] são os mais prevalentes em todo mundo, sendo que o genótipo G1P[8] é o responsável por mais de 50% de infecção em crianças em todo o mundo (Santos e Hoshino, 2005; Silva et al., 2015).

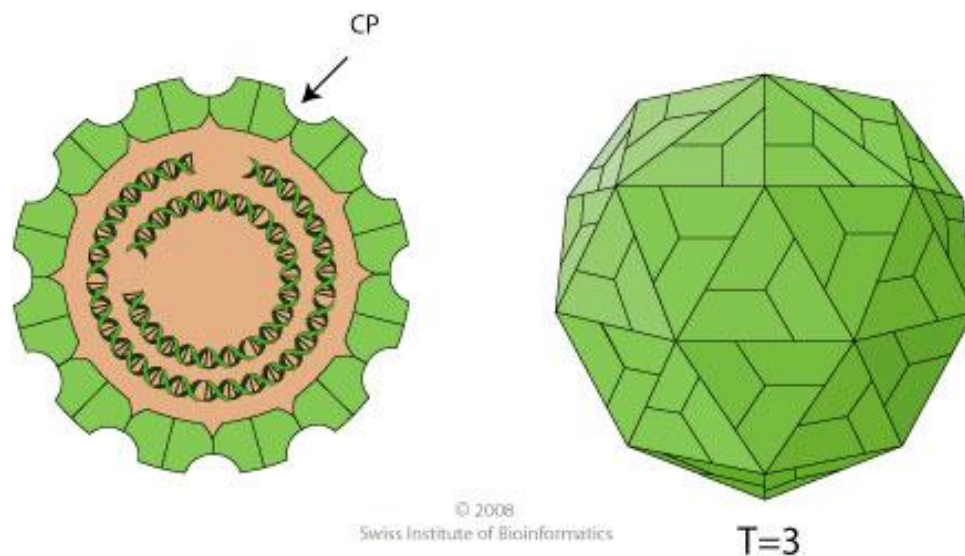
Estudos relatam uma prevalência de rotavírus do grupo A genótipo G2P[6] em neonatos de Belém no período de 1990-1992 (Linhares et.al., 2002, Mascarenhas et.al., 2006). Ao longo de duas décadas, o tipo G1 foi responsável por quase metade das diarreias associadas aos rotavírus (41,3%), sendo que o genótipo G1P[8] concorreu com 72,3% das infecções (Soares, 2006).

Soares e col. (2014) observaram que a prevalência da combinação binária G2P[4] foi de 41% e do genótipo G3P[6] foi de 15% seguido dos demais genótipos G1P[8] (8%), G3P[8] (4%), G9P[8] (3%), e G12P[6] (2%) em amostras de Belém, no período de 2011 a 2012. Este estudo realizado no período pós-vacina Rotarix® (G1P[8], cepa RIX4414) demonstrou um declínio substancial do genótipo G1P[8] enquanto que cepas não usuais como a G3P[8] começaram a emergir.

2.2.3.2 Picobirnavírus

Os picobirnavírus são vírus icosaédricos, não envelopados com 35-41nm de diâmetro e pertencentes à família *Picobirnaviridae*. Apresentam seu genoma viral constituído de RNA dupla fita bissegmentado (Figura 6).

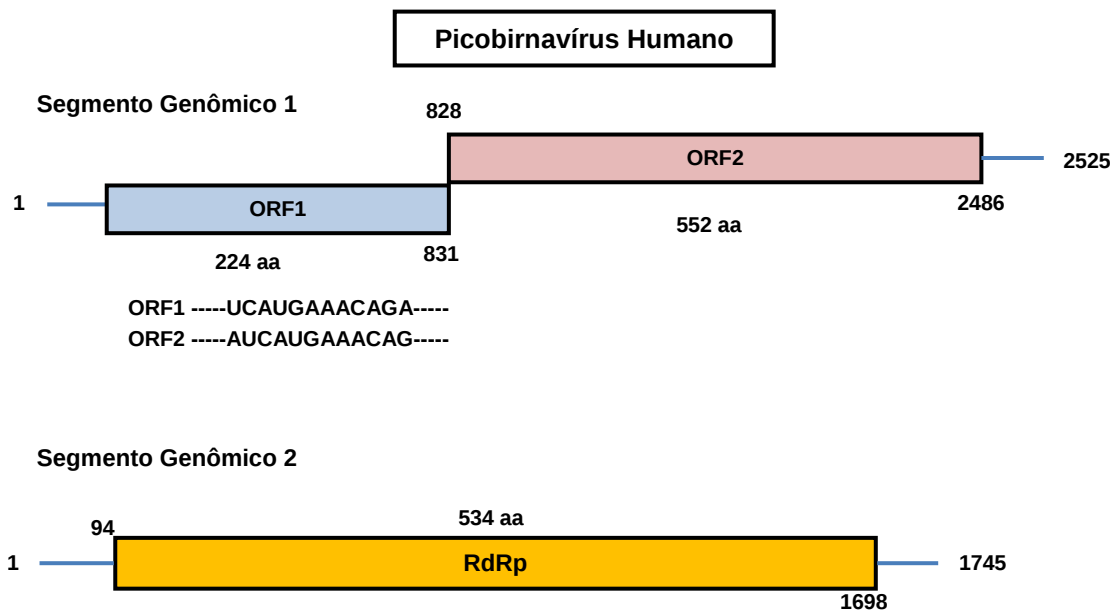
Figura 6. Figura representativa do picobirnavírus demonstrando seus dois segmentos genômicos.



Fonte: Swiss Institute of Bioinformatics, 2008. Disponível em http://viralzone.expasy.org/all_by_species/602.html. Acesso em 2010.

O tamanho dos segmentos genômicos varia de 2,3-2,6 kb para o segmento 1 e 1,5-1,9 kb para o segmento 2 como demonstrado na Figura 7 (Pereira *et al.*, 1988, Ganesh *et al.*, 2010, Wakuda *et al.*, 2005).

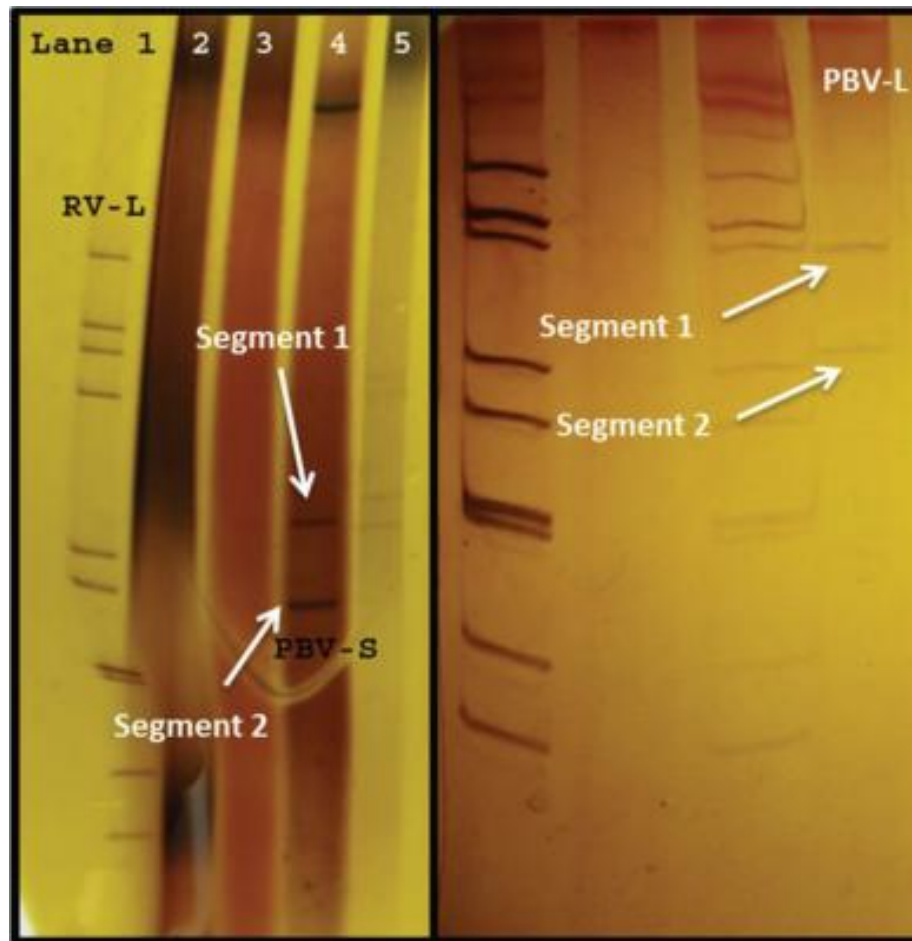
Figura 7. Representação esquemática do genoma dsRNA bissegmentado do Picobirnavírus.



Fonte: Adaptado de Wakuda *et al.*, 2005

Baseado na distância de migração e tamanho dos segmentos 1 e 2 por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) corado por nitrato de prata, o perfil eletroforético é classificado em longo, quando o segmento 1 apresenta aproximadamente 2,2-2,7 kb e o segmento 2 apresenta 1,2-1,9 kb e curto, quando o segmento 1 apresenta aproximadamente 1,75 kb e o segmento 2 possui 1,55 kb; como demonstrado na Figura 8 (Ganesh *et al.*, 2010).

Figura 8. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (EGPA) corado por prata mostrando o genoma bissegmentado dos Picobirnavírus.



(PBV-L) perfil longo do PBV; (PBV-S) perfil curto do PBV em comparação com o perfil genômico dos rotavírus. Fonte: Malik *et al.*, 2014.

O segmento do gene 1 codifica o capsídeo proteico, enquanto que o segmento do gene 2 codifica a RNA dependente da RNA polimerase (RdRp). Os picobirnavírus são classificados em dois genogrupos: I e II, baseado na amplificação gênica da RNA dependente da RNA polimerase (gene RdRp) do segmento 2, como demonstrado no Quadro 2 (Ganesh *et al*, 2010).

Quadro 2 Segmentos genômicos dos Picobirnavirus com suas respectivas funções e classificações.

Segmento genômico	Função da Proteína	Classificação
Segmento 1	Capsídeo proteico	Genogrupo I Genogrupo II
Segmento 2	RdRp	

A nomenclatura dos picobirnavírus foi uniformizada em 2009 e recomenda que a determinação dos genogrupos seja feita como a seguir: GI ou GII/ hospedeiro/ país de origem/ amostra/ ano de isolamento, p.ex. GI/PBV/human/China/1-CHN-97/1997 (Fregolente *et al.*, 2009; Malik *et al.*, 2014).

Com relação à importância clínica deste agente, os picobirnavírus vêm assumindo destaque, já que em alguns casos estão associados a outros enteropatógenos, bem como a quadros de gastroenterite tanto em seres humanos quanto em outros animais (Fregolente *et al.*, 2009; Ganesh *et al.*, 2011; Malik *et al.*, 2014).

Estão ainda associados a quadros diarreicos que vai desde o quadro leve a grave, sendo que em indivíduos imunodeprimidos o quadro tende a ser mais grave. Em seres humanos, esta patogenicidade ainda é questionável, visto que esses agentes já foram detectados em casos sintomáticos e assintomáticos. Portanto, são considerados patógenos diarreicos oportunistas por estarem associados a outros agentes virais

gastroentéricos, podendo elevar a gravidade dos quadros clínicos (Cascio *et al.*, 1996, Giordano *et al.*, 2008, Ganesh *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 1993).

2.3 Comunidade quilombola

Quilombo é uma palavra africana designada a um lugar de pouso ou acampamento, tem origem do quimbundo (ki lombo), ou do umbundo (ochilmbu), línguas faladas por povos bantus da região da Angola. Os quilombos eram o lugar aonde os escravos ou descendentes de escravos negros cujos antepassados no período da escravidão fugiram dos engenhos de cana-de-açúcar, fazendas e pequenas propriedades onde executavam diversos trabalhos braçais para formar pequenos vilarejos chamados de quilombos. No Brasil, o termo passou a designar comunidades autônomas de negros, constituídas a partir de diversos processos, que incluem as fugas com ocupação de terras livres e isoladas, as heranças, doações, recebimentos de terras como pagamento de serviços prestados ao Estado, simples permanência nas terras que ocupavam e cultivavam no interior de grandes propriedades, bem como a compra de terras, tanto durante a vigência do sistema escravocrata quanto após sua abolição (<http://ancestralidadeafricana.org.br/?page_id=117>).

No Brasil, existem quase 2500 comunidades descendentes de quilombo certificadas pela Fundação Cultural Palmares, das quais 157 (6,3%) estão localizadas na Região Sul, 312 (12,6%) na Região Norte, 343 (13,9%) na Região Sudeste, 1543 (62,4%) na Região Nordeste, e 119 (4,8%) na Região Centro-Oeste (<<http://www.palmares.gov.br>>). A maioria dessas comunidades vive em situação de extrema pobreza: 29% deles têm acesso ao serviço de coleta de lixo, 24% a rede de esgoto, e 56% a água potável (Brasil, 2008).

Em se tratando das comunidades quilombolas, no estado do Pará são estimadas 253 comunidades e destas, apenas 79 têm suas terras tituladas e regularizadas pelo Instituto de Terras do Pará (ITERPA). Estas comunidades estão distribuídas pelas mais diversas regiões do Pará com algumas próximas da capital, Belém e outras localizadas

em regiões de difícil acesso como as do Baixo Amazonas, com aproximadamente 28 comunidades. No nordeste paraense existem 41 comunidades, nove na Ilha do Marajó, e uma na região metropolitana de Belém (Marin *et al.*, 2004).

A maioria destas comunidades localiza-se em áreas rurais e apresenta déficit na cobertura de serviços de saneamento básico e de abastecimento de água potável. O abastecimento de água na área urbana é de 89,4% e na área rural de 25,7%. A cobertura de rede de esgoto é ainda mais precária apenas 10,9% na área rural enquanto que na área urbana é de 75,6% (Souza *et al.*, 2002).

Poucos trabalhos foram descritos em comunidades quilombolas com relação à pesquisa de enteropatógenos. Pesquisa sobre parasitos intestinais foram realizados em comunidades do Estado de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santos e Goiás, demonstrando a relação da presença de parasitos com as condições de higiene e a falta de saneamento básico (Andrade *et al.*, 2011, Cabral-Miranda *et al.*, 2010, Carvalho *et al.*, 2012, Damazio *et al.*, 2013, Rangel *et al.*, 2014).

A pesquisa de vírus entéricos nas populações quilombolas foi pouco estudada. Foram descritos dois trabalhos sobre norovírus nas comunidades quilombolas do Estado do Espírito Santos e do Pará (Vicentini *et al.*, 2013, Aragão *et al.*, 2013), enquanto que o rotavírus ainda não foi descrito nas comunidades quilombolas.

3 JUSTIFICATIVA

A Política Nacional de Saúde Integral da População Negra vem definir os princípios, objetivos, diretrizes, bem como as estratégias e as responsabilidades de gestão, voltados para a saúde desta população. Para tanto está voltada a inclusão de ações de cuidado, atenção, promoção à saúde e prevenção de doenças da população negra.

No contexto deste segmento populacional, as doenças infecciosas e parasitárias, aliadas a má nutrição e condições de vida higiênico sanitárias desfavoráveis, tiveram relevante contribuição em toda história do Brasil e ainda hoje permanecem como importantes causas de surtos e óbitos, principalmente na infância. A presença de fluxos migratórios, os aspectos culturais que refletem no estilo de vida e influenciam as atividades agrícolas, o contato com animais domésticos e silvestres tornam estas comunidades vulneráveis à ocorrência de novas endemias.

No Brasil dados relativos às comunidades vulneráveis, em especial as comunidades quilombolas são escassos. Existem poucos trabalhos descritos nessas comunidades com relação à pesquisa de enteropatógenos. Parasitos intestinais foram pesquisados nas comunidades Quilombolas do Estado de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santos e Goiás (Andrade *et al.*, 2011, Cabral-Miranda *et al.*, 2010, Carvalho *et al.*, 2012, Damazio *et al.*, 2013, Rangel *et al.*, 2014). Com relação à pesquisa de vírus entéricos foram descritos apenas três trabalhos sobre norovírus nas comunidades quilombolas do Estado do Espírito Santos e do Pará (Vicentini *et al.*, 2013, Aragão *et al.*, 2013, Fumian *et al.*, 2012).

Desta maneira, o conhecimento da prevalência das doenças diarreicas nessa população se reveste da maior importância para que indicadores epidemiológicos possam ser produzidos. Portanto, caracterizar o perfil etiológico da diarreia nos primeiros anos de vida tem, entre outras finalidades, o estabelecimento de políticas locais de vigilância sanitária, tratamento e profilaxia da doença diarreica (Souza *et al.*, 2002).

Diante desse panorama, justifica-se a necessidade da realização de estudos relacionados à epidemiologia dos enteropatógenos na comunidade quilombola do

Abacatal, visando buscar informações para a construção de indicadores que estejam relacionados, a fim de melhorar a qualidade de vida desta população.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil clínico, epidemiológico e molecular das infecções por agentes virais e parasitários em crianças e adultos da comunidade quilombola do Abacatal, no período de 2008 a 2010.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a frequência, distribuição etária e temporal das infecções causadas pelos agentes virais e parasitários na população sob vigilância;
- b) Identificar os agentes parasitários e virais circulantes na população estudada;
- c) Realizar a caracterização genotípica dos rotavírus e picobirnavírus (grupos, eletroferotipos e genótipos);
- d) Realizar a caracterização genômica e filogenética dos vírus encontrados;
- e) Avaliar o estado nutricional e clínico das crianças nessa população

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

Este estudo é uma extensão do projeto intitulado “Avaliação clínica, epidemiológica e molecular das diarreias por agentes virais e parasitários entre crianças da comunidade quilombola do Abacatal, Ananindeua, Pará” e foi aprovado pelo comitê de ética de pesquisa envolvendo seres humanos do IEC sob o N° 009/2007 (Anexo 1).

5.2 Área de estudo

A comunidade quilombola do Abacatal é um território que foi herdado e marcado pelas regras de um sistema de parentesco e de organização social, mas singulariza-se por sua história e sua identidade social. As famílias que nela residem tem origem na ocupação dos séculos XVIII e XIX e na participação de escravos de origem africana na organização da agricultura comercial que se ligava estreitamente à Belém do Grão Pará (Marin *et al.*, 2004).

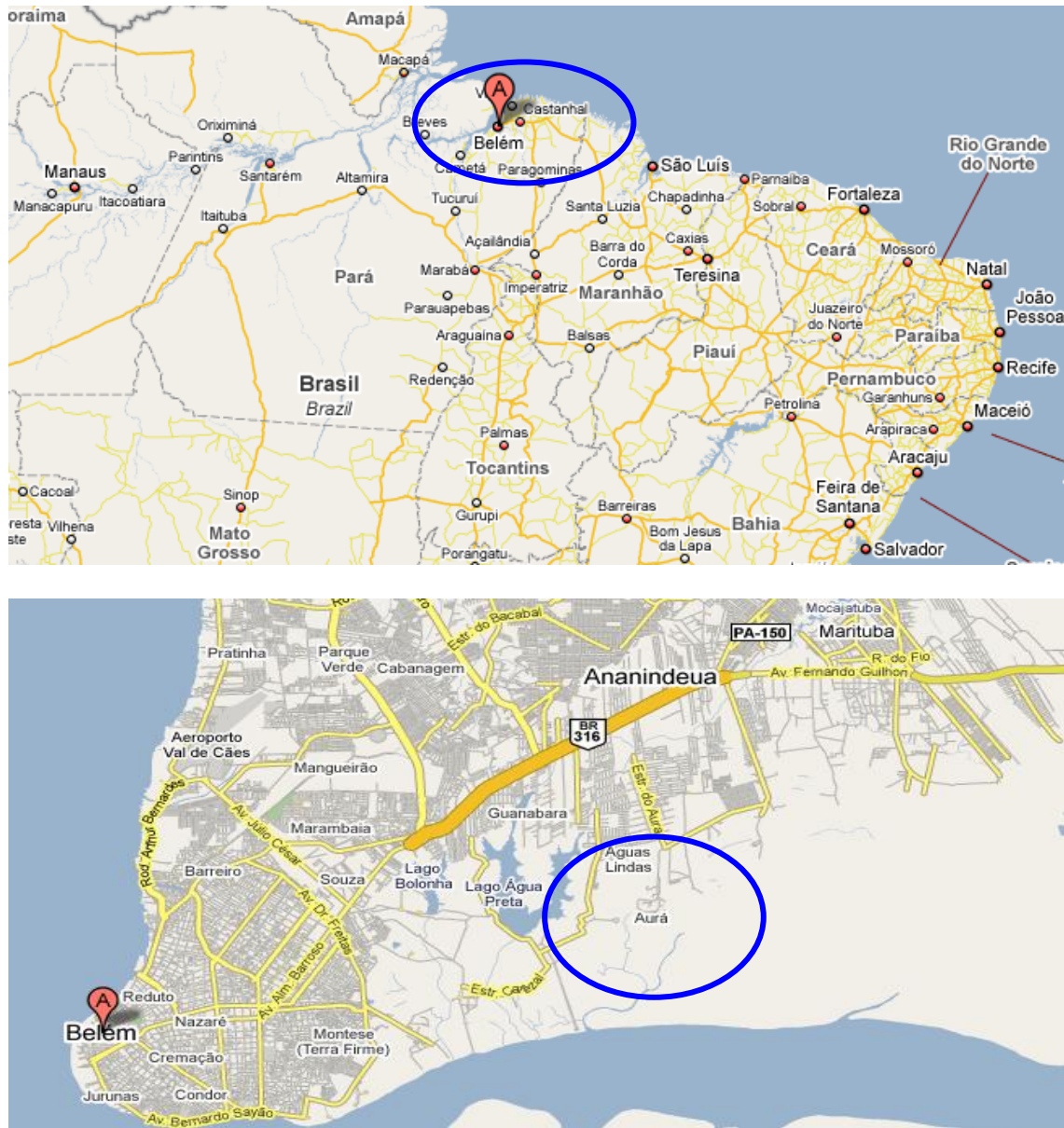
Está localizada no município de Ananindeua, Pará, situada na mesorregião metropolitana de Belém. Possui uma área de aproximadamente 308 hectares, regulamentadas e legalizadas pelo ITERPA (Figuras 9 e 10). É constituída por 84 famílias, sendo que a população é estimada em 400 habitantes, incluindo 120 crianças menores de dez anos de idade.

A comunidade quilombola do Abacatal é semi-isolada, pois sua localização é de difícil acesso com os municípios vizinhos, Ananindeua e Marituba (Figura 11). A comunidade possui apenas uma escola primaria e não apresenta infraestrutura de rede de esgoto, água encanada na sua e posto de saúde. A comunidade cria poucos animais para sua subsistência como suínos, aves e eqüinos e dispõe ainda de animais domésticos como caninos e felinos (Figura 12).

Toda a economia local vem da agricultura de subsistência e da venda de seus subprodutos nos municípios vizinhos. Esta comunidade desenvolve diversas atividades

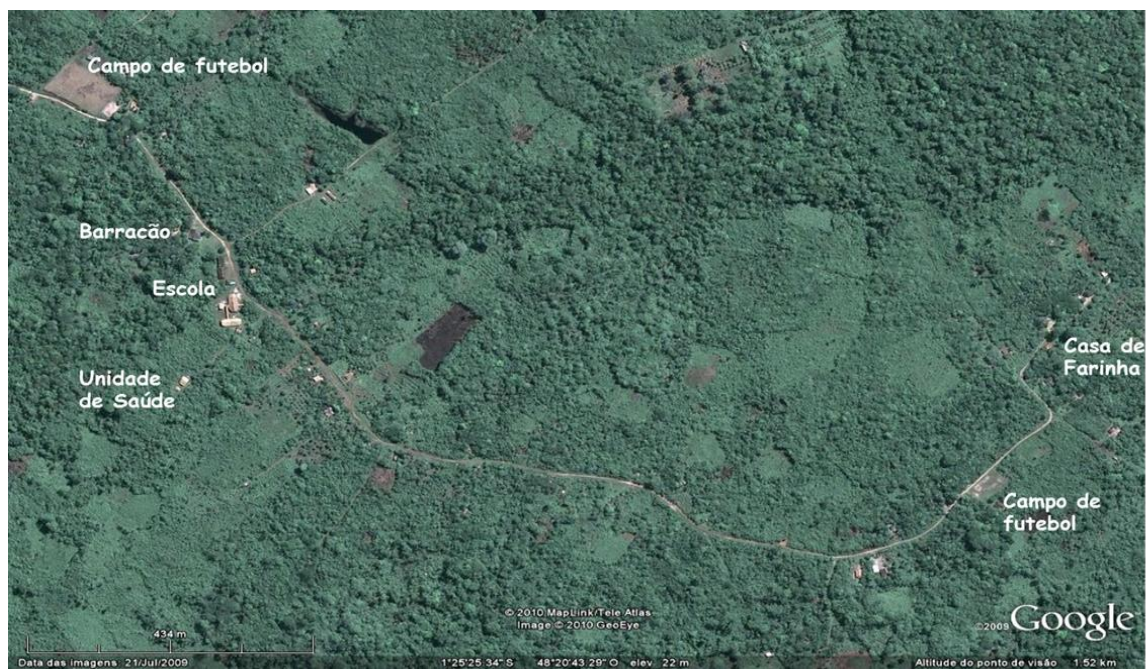
econômicas, tais como: plantação de hortaliças, roçados, produção e venda de carvão e farinha, coleta e comercialização de açaí; e extração e venda de madeira e pedra (Figura 13).

Figura 9. Localização geográfica da Comunidade Quilombola do Abacatal.



Fonte: Google mapas. <https://maps.google.com.br/>. Acessado em 21/Jul/2009

Figura 10. Mapa da área geográfica da Comunidade Quilombola do Abacatal.



Fonte: Google mapas. <https://maps.google.com.br/>. Acessado em 21/Jul/2009

Figura 11. Estradas de acesso à Comunidade Quilombola do Abacatal.



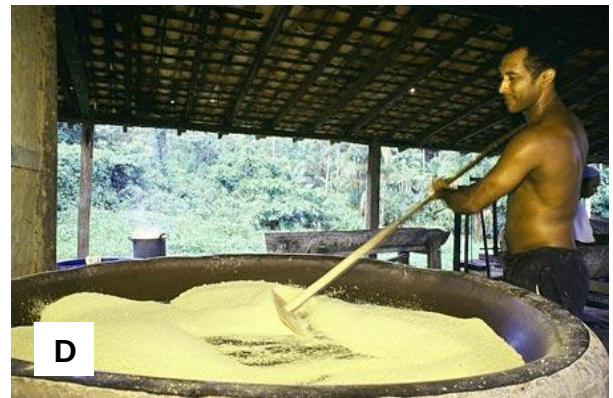
Fonte: IEC / Seção de Virologia / MS.

Figura 12. Características da Comunidade Quilombola do Abacatal.



(A) Fonte de água utilizada pela maioria dos moradores. (B, C e D) Tipo de moradia predominante: casas de madeira e barro. (E) Pequena criação de suínos para subsistência. (F) Criação de cães sem raça definida como animais de estimação. Fonte: IEC / Seção de Virologia / MS

Figura 13. Atividades econômicas da Comunidade Quilombola do Abacatal.



(A) Extrativismo vegetal. (B) Extração de açaí. (C e D) Produção de farinha de mandioca. (E e F) Comercialização dos produtos de subsistência nas feiras livres da mesorregião metropolitana de Belém.
Fonte: IEC / Seção de Virologia / MS.

5.3 Espécimes clínicos

As amostras fecais foram obtidas de 294 crianças na faixa etária de 0 a 10 anos e 81 amostras de indivíduos acima de 10 anos, residentes na comunidade quilombola do Abacatal, Ananindeua, Pará, que apresentaram quadro de diarreia aguda definida como três ou mais evacuações aquosas ou líquidas acompanhadas de febre, vômitos e cólicas além daquelas que não apresentaram diarreia (controles).

As amostras fecais foram colhidas no período de abril de 2008 a setembro de 2010, por meio de busca ativa, sendo realizadas duas visitas semanais regulares no período mais seco e pelo menos uma visita no período mais chuvoso, em razão da dificuldade de acesso à comunidade quilombola do Abacatal para colheita de espécimes clínicos e atendimento médico com aplicação de questionário próprio e individual (Quadro 3).

Quadro 3. Distribuição das amostras fecais por faixa etária e ano de coleta dos indivíduos residentes da Comunidade Quilombola do Abacatal.

Idade/ Ano	2008	2009	2010	Total
0-10	68	125	101	294
>10	14	8	59	81
Total	82	133	160	375

A vacinação contra o rotavírus foi introduzida no calendário de vacinação do MS a partir de 2006, e das 20 crianças elegíveis para receber a vacina (0-2 meses) apenas 3 crianças foram imunizadas dos 176 indivíduos.

Após a chegada dos espécimes clínicos no laboratório, as 375 amostras fecais obtidas de 177 indivíduos foram processadas na Seção de Virologia para a pesquisa de rotavírus e picobirnavírus. Para a realização dos métodos diretos e de sedimentação espontânea visando à identificação de helmintos e protozoários, 349 amostras fecais foram testadas a partir 174 indivíduos. Portanto, 26 amostras fecais não foram submetidas ao teste parasitológico devido à insuficiência de material.

5.4 Identificação dos agentes virais

5.4.1 Suspensão fecal

Foram preparadas suspensões fecais em solução salina tamponada (PBS) com penicilina e estreptomicina visando à extração do RNA viral. Em seguida as suspensões foram homogeneizadas e centrifugadas a 5500rpm por 10 min a 4°C, seguida da coleta do sobrenadante, o qual foi armazenado a -20°C até a realização dos testes.

5.4.2 Imunocromatografia

Para o diagnóstico inicial de rotavírus da espécie A foi utilizado o teste imunocromatográfico por meio de kit disponível comercialmente (RIDAQUICK® Rotavírus), segundo as recomendações do fabricante.

5.4.3 Extração do genoma viral

O genoma viral foi extraído a partir das suspensões fecais de acordo com o método descrito por Boom *et al.* (1990) que consistiu em pipetar 300 µL da suspensão

fecal em um tubo de 1,5 mL seguido da adição de 20 µL de Proteinase K (20mg/mL) e 800 µL de Tampão L6. Após agitou-se em vortex e incubou-se em banho-maria a 56°C por 10 minutos. A seguir adicionou-se 200 µL de etanol absoluto (96%) gelado e 20µL de sílica seguido de homogeneização em agitador de kline por 20 minutos a TA. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 40 segundos e descartou-se o sobrenadante em frasco contendo NaOH 10N. Adicionou-se 500 µL de Tampão L2, homogeneizou-se em vortex e centrifugou-se a 14.000 rpm por 30 segundos.

O sobrenadante foi descartado em frasco contendo NaOH 10N (gelado) seguido da adição de 500 µL de Etanol a 70%. Homogeneizou-se a mistura em vortex e centrifugou-se a 14.000 rpm por 40 segundos. Descartou-se o sobrenadante em frasco contendo NaOH 10N. Adicionou-se ao tubo 500 µL de Acetona, homogeneizou-se em vortex e centrifugou-se a 14.000 rpm por 40 segundos. Descartou-se novamente o sobrenadante em frasco contendo NaOH 10N e secou-se o sedimento em banho-maria com a tampa aberta a 56°C por 15 minutos. Adicionou-se 60 µL de água Rnase free e homogeneizou-se em vortex seguido de incubação em banho-maria a 56°C por 15 minutos novamente com a tampa do banho-maria fechada. Homogeneizou-se em vortex e centrifugou-se a 14.000 rpm por 5 minutos. Coletou-se cuidadosamente o sobrenadante (30 a 40µL) e transferiu-se o dsRNA puro para um tubo previamente identificado seguido de armazenamento à -20°C para a realização dos testes de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e amplificação genômica. O preparo dos reagentes está demonstrado no Anexo 2.

5.4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)

Todos os espécimes fecais foram submetidos à EGPA para análise dos perfis eletroforéticos, bem como a detecção de amostras eventualmente não pertencentes ao grupo A, de acordo com o procedimento descrito por Pereira *et al.* (1983) de acordo com o constante do quadro 4.

Quadro 4. Reagentes para preparo de gel de poliacrilamida

REAGENTES	CUBA PEQUENA (para 2 géis pequenos)	CUBA GRANDE (para 4 géis pequenos)
Acrilamida/Bis-acrilamida	3,32 mL	6,64 mL
Tris base	3,74 mL	7,48 mL
Água destilada	12,56 mL	25,12 mL
Persulfato de amônia 10%*	400 µL	800 µL
TEMED*	20 µL	40 µL

* Catalisadores

Após a polimerização, retirou-se o pente e lavou-se com água destilada. Montou-se as placas com o gel polimerizado na cuba de eletroforese e preparou-se o tampão de eletroforese de acordo com o Quadro 5.

Quadro 5. Reagentes para preparo do tampão de eletroforese.

REAGENTES	CUBA PEQUENA	CUBA GRANDE
Tampão tris glicina 10X	10 mL	25mL
Água destilada q.s.p.	100 mL	250mL

O tampão de corrida foi colocado no reservatório e aplicou-se 2µL de azul de bromofenol juntamente com 10µL da amostra a cada orifício do gel. Conectou-se os eletrodos na cuba de eletroforese e posteriormente conectou-se na fonte selecionada para 100V, 21mA e 100W. Deixou-se por duas horas (cuba pequena) e quatro horas e meia (cuba grande). Retirou-se o gel entre as placas após o tempo de corrida e colocou-se em um recipiente de vidro. Colocou-se o fixador juntamente com o gel que ficou sob agitação orbital a TA por 20 minutos. Desprezou-se o fixador, adicionou-se o corante e deixou-se em agitador orbital a TA novamente por 20 minutos. Desprezou-se

o corante e lavou-se duas vezes com água destilada. Adicionou-se cerca de 50mL do revelador, para tirar o excesso do corante, e desprezou-se. Adicionou-se o restante do revelador e levou-se o gel para visualização do perfil eletroforético de rotavírus em negatoscópio. Após o aparecimento das bandas, desprezou-se o revelador e adicionou-se a solução para parar a reação (Anexo 3).

5.4.5 Amplificação genômica para rotavírus (espécies A e C) e picobirnavírus

Para identificação do rotavírus da espécie C foi realizada uma RT-PCR usando os iniciadores C1/C4 (gene VP6), amplificando um produto de 354pb seguido da Nested-PCR para o gene VP6 com os iniciadores BMJ281/C3 produzindo um produto de 240pb (Gouvea et al., 1991). Para o gene VP7 foi utilizado os iniciadores G8S/G8A amplificando um produto de 1063pb (Kuzuya et al., 1996).

Para detecção de picobirnavírus os iniciadores PicoB25-PicoB43 (RdRp gene) foram utilizados para determinar o genogrupo I, segundo Rosen *et al.*, 2000 (Quadro 6).

Quadro 6. Lista de iniciadores usados na amplificação dos genes VP6, VP7 dos RVA e Seg 2 PBV.

Gene	Nome do primer	Seqüência	Amplicon ou posição do primer (pb)	Referências
VP6	C1	5'CTCGATGCTACTACAGAATCAG3'	354	Gouvea <i>et al.</i> , (1991)
	C4	5'AGCCACATAGTTCACATTTTCATCC3'		
VP7	G8S	5'GGCATTATAAAAAAGAAGAAGCTGT3'	1063	Kuzuya <i>et al.</i> , (1996)
	G8A	5'AGCCACATGATCTTGTTTACGCG3'		
Nested VP6	BMJ281	5'TCAGCRATGCCAGCTGGAAC3'	250	Gouvea <i>et al.</i> , (1991)
	C3	5'GGGATCATCCACGTCATGCG3'		
PBV Genogrupo I	PicoB25	5'TGGTGTGGATGTTTC3	201	Rosen <i>et al.</i> , (2000)
	PicoB43	5'A(G,A)TG(C,T)A(G,A)TG(C,T)TGGTCGAACTT3'		

A reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) foi desenvolvida para os genes VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 de acordo com o preconizado por Nakagomi e Kaga, 1995 (NSP1), Matthijnssens *et al.*, 2006 (NSP3 e NSP5), Cunliffe *et al.*, 1997 (NSP4), Varghese *et al.* 2006 (VP1, VP2 e VP3), Gentsch *et al.*, 1992 (VP4), Iturriza-Gómara *et al.*, 2002 (VP6), Das *et al.*, 1994 e Gouvea *et al.*, 1990 (VP7), como descrito no Quadro 7.

As reações de RT-PCR e PCR foram padronizadas com Tampão de reação 1X, 200 µM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,2 U RT polimerase (Invitrogen), 0,5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 20 pmoles de oligonucleotídeos.

A reação de PCR foi padronizada nas seguintes condições de ciclagem: Picobirnavírus Genogrupo I (94°C – 5 min, 94°C – 1 min, 42°C – 2 min, 72°C – 1 min, 30 ciclos, 72°C – 10 min) ; RVC VP6 e VP7 (94°C – 5 min, 94°C – 1 min, 50°C – 1 min, 72°C – 1 min, 30 ciclos, 72°C – 10 min) ; RVC Nested-PCR VP6 (94°C – 5 min, 94°C – 30 seg, 48°C – 30 seg, 72°C – 45 seg, 30 ciclos, 72°C – 10 min) ; RVA VP4, VP7 e NSP4 (94°C – 5 min, 94°C – 1 min, 42°C – 2 min, 72°C – 1 min, 30 ciclos, 72°C – 10 min) ; RVA VP6, VP1, VP2 e VP3 (94°C – 5 min, 94°C – 1 min, 55°C – 2 min, 72°C – 1 min, 30 ciclos, 72°C – 10 min) ; RVA NSP1, NSP2, NSP3 e NSP5 (94°C – 5 min, 94°C – 1 min, 45°C – 2 min, 72°C – 1 min, 30 ciclos, 72°C – 10 min).

Quadro 7. Sequência de iniciadores usados para a amplificação dos genes estruturais e não estruturais dos rotavírus por RT-PCR.

Gene	Nome do primer	Sequência	Amplicon ou posição do primer (pb)	Referências
NSP1	NSP1F	5'-GGG CTT TTT TTT GAA AAG TC-3'	1565	Nakagomi e Kaga. (1995)
	NSP1R	5'-GGT CAC ATT TTA TGC TGC CTA-3'		
NSP2	K-NSP2F	5'-GGC TTT TAA AGC GTC TCA GTC-3'	1038	Mijatovic-Rustempasic <i>et al.</i> (2011)
	K-NSP2R	5'- GT CAC ATA AGC GCT TTC TAT-3'		
NSP3	GEN-NSP3F	5'-GGC TTT TAA TGC TTT TCA GTG-3'	1062	Matthijnssens <i>et al.</i> (2006)
	GEN-NSP3R	5'- ACA TAA CGC CCC TAT AGC-3'		
NSP4	JRG 30 F	5'-GGC TTTTAAAAGTTCTGTT-3'	738	Cunliffe <i>et al.</i> (1997)
	JRG 31R	5'-ACCATTCTTCCATTAAC-3		
NSP5	GEN-NSP5F	5'-GGC TTT TAA AGC GCT ACA G-3'	664	Matthijnssens <i>et al.</i> (2006)
	GEN-NSP5R	5'-GGT CAC AAA ACG GGA GT-3'		
VP1	VP1F	5'-GGCTATTAAAGCTGTACAATGGG-3'	686	Varghese <i>et al.</i> (2006)
	VP1R	5'-TAATCCTCATGAGAAAACACTGAC-3'		
VP2	VP2F	5'-GGCTATTAAAGGCTCAATGGCG-3'	686	Varghese <i>et al.</i> (2006)
	VP2IR	5'-CTTCATCTTGAAATATAGCAATCAC-3'		
VP3	VP3F	5'-GGCTATTAAAGCAGTACCAGTAG-3'	702	Varghese <i>et al.</i> (2006)
	VP3IR	5'-GTAAACATAGATTCATTACGCGGACC-3'		
VP4	Com 4 con3 F	5'-TGG CTT CGC CAT TTT ATA GAC A-3'	876	Gentsch <i>et al.</i> (1992)
	Con 4con 2 R	5'-ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC-3'		
VP6	FVP6	5'-GGCTTTTAAACGAAGTCTTC-3'	1356	Both <i>et al.</i> , (1984)
	RVP6	5'-GGTCACATCCTCTCACTACA-3'		
VP7	9con1 F	5'-TAT TAC ATT GCA TTT CTT TCC-3'	904	Das <i>et al.</i> (1994)
	9con2 R	5'-GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA-3'		
VP7	Beg9 F	5'GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG-3'	1062	Gouvea <i>et al.</i> (1990)
	End9 R	5'-GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG-3'		

5.4.6 Sequenciamento dos “amplicons” e análise filogenética dos genes VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP2 NSP3, NSP4 e NSP5.

Os produtos da PCR foram purificados por meio do *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen, CA, USA) e, posteriormente, sequenciados com os mesmos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR. O sequenciamento foi realizado utilizando-se o kit comercial *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1* (Applied Biosystems, CA, USA). Foi realizada a precipitação em etanol/isopropanol e o DNA foi ressuspensão em formamida. A eletroforese foi realizada no sequenciador automático ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems). As sequências obtidas dos respectivos genes foram alinhadas e editadas no *BioEdit Sequence Alignment Editor* (version 6.0.5.2) e submetidas à análise filogenética utilizando o software *MEGA3 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis – version 3.0.0.41)*. As distâncias calculadas entre as sequências foram analisadas pelo algoritmo de *Neighbor-joining*, baseado no método de estimativa de distância de Tajima-Nei parâmetros. A “validez estatística” (*robustness*) foi calculada mediante a realização de 1.000 pseudo-réplicas por meio do método de *bootstraps*.

As amostras de referência e protótipos para os genes em estudo foram obtidas no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information, USA* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/) e as sequências de nucleotídeos foram comparadas com aquelas disponíveis no *GeneBank* para que fossem definidos os dendogramas correspondentes.

5.5 Identificação dos enteroparasitas

Os exames parasitológicos foram realizados a partir das 349 amostras de fezes coletadas de 174 indivíduos. Das 375 amostras coletadas, 26 amostras não foram submetidas ao teste parasitológico por insuficiência de material.

Os espécimes fecais foram analisados sob microscopia de luz, para pesquisa de formas evolutivas de protozoários e helmintos após emprego dos métodos de sedimentação espontânea, Baermann-Moraes e exame direto (salina/lugol) (Hoffman et

al., 1934; Faust *et al.*, 1939). Duas lâminas por cada amostra foram analisadas para detectar parasitas usando microscópio óptico com lente objetiva de 100x e 400x.

5.6 Análise estatística

Os dados clínico e epidemiológicos foram coletados por meio de uma ficha (Apêndice B) e inseridos em planilhas no Programa Microsoft Excel 2010. Os dados foram processados e as frequências e percentuais calculados e apresentados sob a forma de tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada pelo Programa Graph Pad Prism 5.0 e BioEstat 5.0, utilizando os testes não paramétricos Qui-quadrado (χ^2) de partição, Qui-quadrado para tabelas de contingência, Teste G de Williams e Teste Binomial para 2 proporções, estabelecendo nível de significância com $p < 0.05$.

5.7 Dados clínicos e epidemiológicos

Os dados epidemiológicos foram obtidos por meio do preenchimento das fichas clínico epidemiológicas (Apêndice B) e após avaliação médica e nutricional. Todos os indivíduos foram clinicamente avaliados e posteriormente tratados.

A intensidade do quadro clínico da gastroenterite foi avaliada por uma médica pediatra pertencente ao estudo sendo definida como episódio de intensidade leve somente a presença de diarreia, moderado a presença de diarreia e episódios de vômitos e grave a ocorrência de diarreia, vômitos e febre, conjuntamente. As crianças que não apresentaram nenhum dos três sinais/sintomas foram consideradas como assintomáticas ou controles.

A avaliação nutricional foi realizada por uma nutricionista em 38 crianças de 0 a 10 anos de ambos os sexos residentes na Comunidade Quilombola do Abacatal no período de abril a dezembro de 2010. Os parâmetros antropométricos utilizados foram peso, estatura e idade. Como parâmetro dietético utilizou-se o recordatório alimentar de 24 horas. Para se avaliar o estado nutricional das crianças foi utilizado o índice antropométrico Peso/Idade, Estatura/Idade, Peso/Estatura, IMC/Idade e o ponto de

corte expresso em unidades de desvio-padrão ou escore Z recomendado pela OMS e adotado pelo Ministério da Saúde (2008).

6 RESULTADOS

6.1 Detecção dos agentes virais

De abril de 2008 a setembro de 2010 foram obtidas 375 amostras de fezes provenientes de 177 indivíduos incluindo 113 (63,84%) crianças de 0 a 10 anos e 64 (36,16%) indivíduos acima de 10 anos, com quadro clínico diarreico além de não diarreicos (controles). Das 375 amostras 112 (30%) e 263 (70%) amostras foram coletadas de 64 indivíduos com quadro clínico diarreico e 113 indivíduos sem diarreia, respectivamente (Quadros 8 e 9).

Quadro 8. Número de amostras coletadas por indivíduos com relação ao quadro clínico, durante o período de 2008 a 2010 na comunidade quilombola do Abacatal.

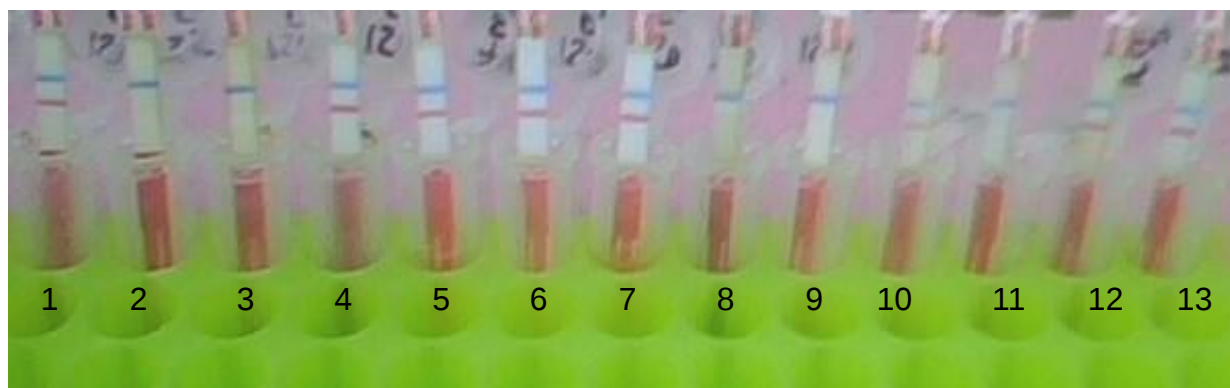
Quadro Clínico	Nº de indivíduos	Nº de amostras
Diarreico	64	112
Não Diarreico	113	263
Total	177	375

Quadro 9. Número de amostras coletadas por indivíduos com relação à idade e ao quadro clínico, na comunidade quilombola do Abacatal, durante o período de 2008 a 2010.

Idade/anos	Quadro Clínico	Nº de indivíduos n=177	Nº de amostras n=375
0-10	Diarreico	44	90
	Não Diarreico	69	204
Total		113	294
>10	Diarreico	20	22
	Não Diarreico	44	59
Total		64	81

Os espécimes fecais foram processados pelo teste de triagem por imunocromatografia (RIDAQUICK® Rotavírus) e confirmados por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Das 375 amostras testadas pelo teste imunocromatográfico, 23 (6,13%), resultaram positivas para RVA, 5 (1,33%), indeterminadas e 347 (92,54%), negativas (Figura 14).

Figura 14. Teste imunocromatográfico para detecção de RVA (RIDAQUICK® Rotavirus).



Amostras RVA negativas: 2, 3, 8, 9 e 11; Amostras RVA positivas: 1, 4, 5, 6, 7, 10, 12 e 13. As amostras positivas apresentam as linhas azuis e vermelhas, enquanto que as amostras negativas apresentam apenas a linha azul. Fonte: Autoria do autor

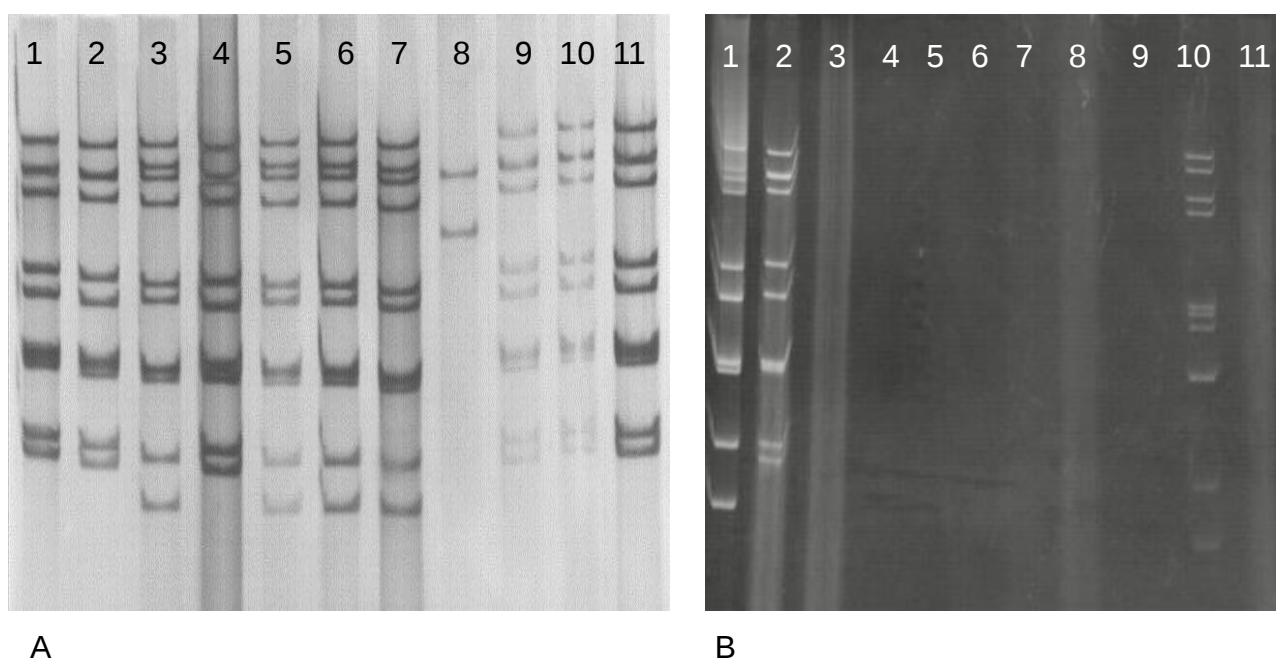
A EGPA confirmou a presença de RVA nas 23 amostras positivas para RIDAQUICK ® com 10 (43,48%) amostras apresentando perfil curto e 13 (56,52%), perfil longo.—Naquelas amostras que se apresentaram indeterminadas pelo teste RIDAQUICK®, a EGPA confirmou a presença de uma amostra positiva para picobirnavírus e nas amostras negativas foi confirmada a presença de quatro amostras positivas para picobirnavírus, uma amostra positiva para RVA perfil curto e uma amostra RVC (Quadro 10).

Quadro 10. Resultados dos testes RIDAQUICK ® e EGPA das amostras coletadas na comunidade quilombola do Abacatal, durante o período de 2008 a 2010.

Amostras	Teste RIDAQUICK ®	EGPA
Positiva	23	23 RVA
Indeterminada	5	1 PBV
Negativa	347	4 PBV 1 RVA 1 RVC

As frequências dos agentes virais encontrados no presente estudo foram: RVA 6,4% (24/375), RVC 0,3% (1/375) e PBV 1,3% (5/375), todos confirmados por RT-PCR (Figura 15).

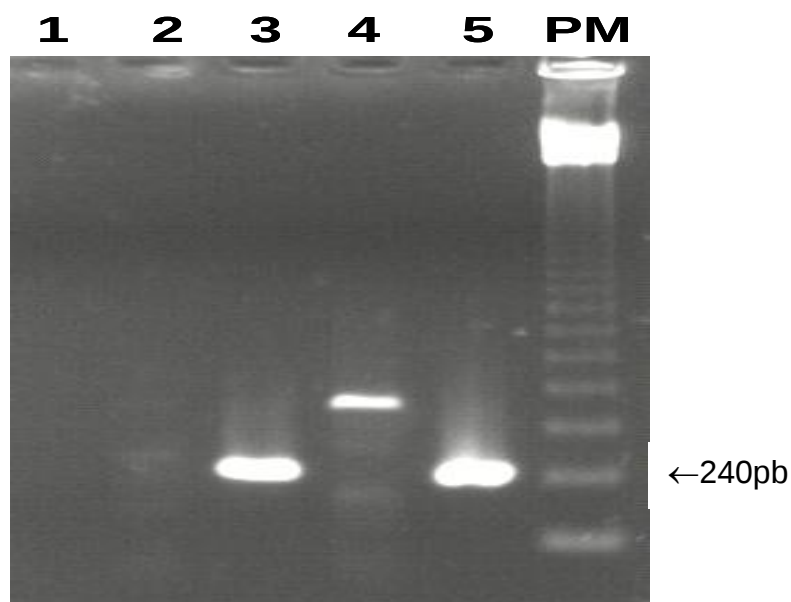
Figura 15. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA) dos agentes virais.



(A) 1, 2, 4, 9, 10 e 11 - Amostras RVA perfil curto; 3, 5, 6 e 7 - Amostras RVA perfil longo; 8 - Amostra PBV positiva. (B) 1 - Controle RVA perfil longo; 2 - Controle RVA perfil curto; 10 - Amostra RVC. Fonte: Autor.

Os PBV apresentaram uma frequência de 1,3% (5/375), sendo 2,7% (3/110) em pacientes diarreicos e 0,7% (2/265) no grupo assintomático. As amostras foram submetidas à EGPA, mostrando dois segmentos genômicos como demonstrado na figura 10A e confirmada por reação em cadeia mediada por RT-PCR e sequenciamento do produto amplificado, como sendo genogrupo I, como demonstrado pela amplificação do produto de 240 pb (Figura 16).

Figura 16. Detecção de Picobirnavírus do Genogrupo I por RT-PCR e visualizado em gel de agarose 1,5%, corado por Syber Safe.

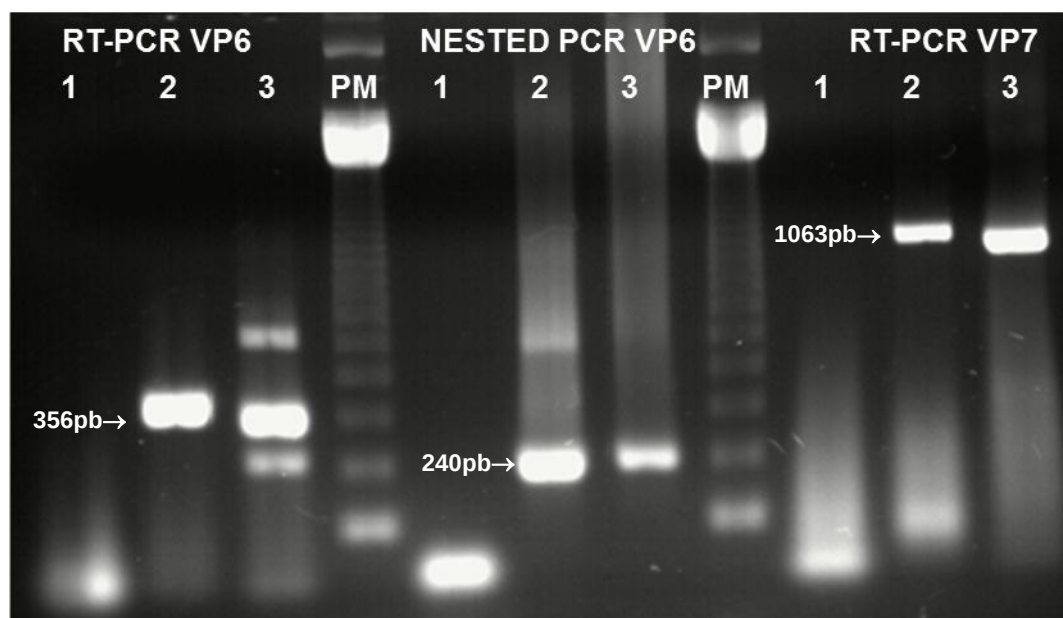


(1, 2 e 4) Amostras Negativas; (3 e 5) Amostras Positivas (fragmento de 240pb); (PM) Peso molecular de 123pb.

O PBV foi detectado em duas amostras provenientes de crianças menores de 10 anos não diarreicas e em três amostras diarreicas, incluindo crianças e adultos, sendo (2/3) apresentando quadro clínico leve e (1/3), moderado.

O rotavírus do grupo C foi confirmado com a amplificação dos genes VP6 e VP7 por RT-PCR (Figura 17).

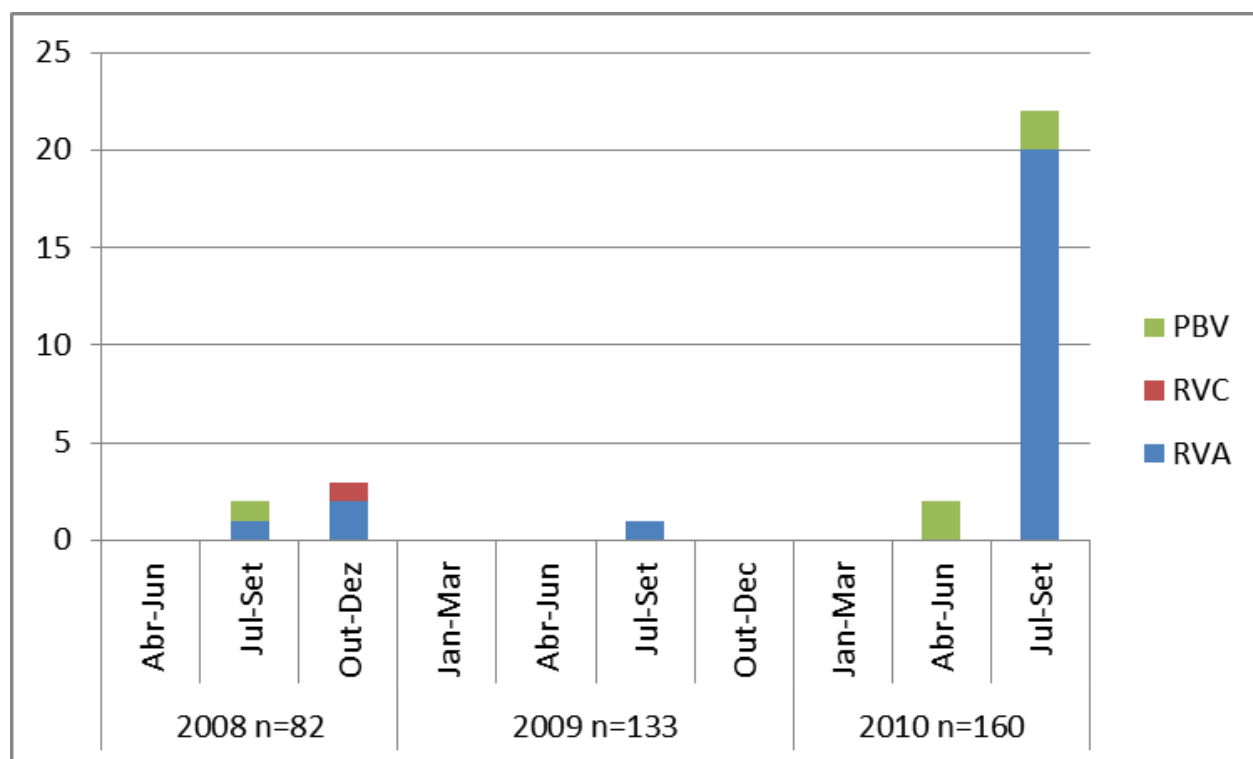
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose mostrando RT-PCR e Nested-PCR dos genes VP6 e VP7 de RVC corados com Syber Green.



(1) Controle negativo; (2) Controle positivo para RVC; (3) Amostra positiva RVC; (PM) Marcador de peso molecular de 123 pares de base.

A Figura 18 mostra a distribuição temporal dos agentes virais associados ou não a casos de gastroenterite em crianças e adultos. Os RVA foram observados durante os três anos de estudo, e o RVC foi detectado em um paciente diarreico apenas no ano de 2008. Neste mesmo período, o RVA foi detectado em 3,6% (3/82) dos casos e em 2009 apenas uma amostra foi positiva (0,77%; 1/133). Já no período de 2010 foi registrado um surto causado por RVA envolvendo crianças e adultos durante julho-setembro, com uma taxa de positividade global de 12,5% (20/160). Destes, 16 eram de pacientes com diarreia e 4 de indivíduos não diarreicos.

Figura 18. Distribuição dos agentes virais na comunidade quilombola do Abacatal entre 2008 a 2010.



PVB: Picobirnavírus, RVC: Rotavírus do grupo C, RVA: Rotavírus do grupo A

A Tabela 1 mostra as frequências de vírus entéricos de acordo com a distribuição etária e características clínicas. Os RV foram detectados com maior frequência em pacientes adultos com diarreia ($p \leq 0,05$).

Tabela 1. Detecção de rotavírus e picobirnavirus em amostras fecais dos grupos diarreicos e não diarreicos na Comunidade Quilombola do Abacatal no período de abril de 2008 a setembro de 2010.

	RVA			PBV		
	Positivo	%	p-valor	Positivo	%	p-valor
Idade/anos						
0-1 (n=35)	1	2,9	-	0	0	-
>1-5 (n=162)	7	4,3	0,74	1	0,6	0,77
>5-10 (n=97)	7	7,2	0,29	2	2,1	0,27
>10 (n=81)	9	11,1	0,05*	2	2,5	0,31
Grupo						
Diarreico (n=112)	20	18,2	0,001*	3	2,7	0,2
Não diarreico (n=263)	4	1,5	-	2	0,7	0,3

Teste Qui-quadrado de partição

*Estatisticamente significativa

6.2 Detecção dos agentes parasitários

Os exames parasitológicos foram realizados em 349 amostras de fezes coletadas de 174 indivíduos. A presença de enteroparasitas foi observada em 272 (77,94%) amostras e a ausência em 77 (22,06%) amostras. Indivíduos mono parasitados apresentaram uma frequência de 28,67% (78/272), enquanto que aqueles poli parasitados com pelo menos dois parasitas foram de 71,33% (194/272) nos grupos com e sem diarreia. A infecção poli parasitária apresentou-se maior no grupo não diarreico com 72,81% ($p=0,0019$) com pelo menos dois parasitas e 44,17% nas amostras e com mais de dois parasitas como demonstrado na tabela 2. Um indivíduo não diarreico apresentou infecção poli parasitária com 8 (0,48%) parasitos entéricos.

Tabela 2. Frequência de infecções parasitárias encontradas nas fezes de crianças e adultos com e sem diarreia da comunidade quilombola do Abacatal.

Infecção parasitária	Grupos		Total n=349
	Diarreico (n=106)	Não diarreico (n=243)	
Negativo	40 (37,73%)	37 (15,23%)	77 (22,06%)
Positivo	66 (62,27%)	206 (84,77%)	272 (77,94%) *
Mono parasita	22 (33,33%)	56 (27,18%)	78 (28,67%)
Poli parasita	44 (66,66%)	150 (72,81%)	194 (55,59%) **

Teste Qui-quadrado: Tabela de Contingência

* $p=0,0001$

** $p=0,0019$

A Tabela 3 apresenta as frequências de parasitas associados à distribuição etária e características clínicas. Das 349 amostras positivas, o helminto mais frequente foi o *Ascaris lumbricoides* detectado em 13,18% (46/349) das amostras, seguido por

Trichuris trichiura com 10,89%, ancilostomídeos com 4,01% e *Strongyloides stercoralis* 1,72%. Com relação aos protozoários, a *Entamoeba histolytica/dispar* foi a mais frequente com 27,80%, seguida da *Endolimax nana* (15,47%), *E. coli* com 12,03% e *Giardia lamblia* (10,02%). O grupo não diarreico apresentou maior frequência de *E. histolytica/dispar*, *E. nana*, *E. coli*, enquanto que no grupo diarreico houve maior frequência de *A. lumbricoides*, *T. trichiuras* e ancilostomídeo.

Tabela 3. Frequência dos agentes parasitários encontrados nas fezes de crianças e adultos com e sem diarreia da comunidade quilombola do Abacatal.

Agente parasitário	Grupo		Total n=349	p-valor
	Diarreico (n=106)	Não diarreico (n=243)		
<i>E. histolytica/dispar</i>	20 (18,86%)	77 (31,68%)	97 (27,80%)	<0,01*
<i>E. nana</i>	19(17,92%)	35 (14,40%)	54 (15,47%)	<0,05**
<i>E. coli</i>	11 (10,38%)	31(12,75%)	42 (12,03%)	<0,01*
<i>G. lamblia</i>	15(14,15%)	20 (8,23%)	35 (10,02%)	>0,05
<i>B. hominis</i>	11(10,38%)	8 (3,29%)	19 (5,44%)	>0,05
<i>Entamoebas</i>	0 (0,00%)	3 (1,23%)	3 (0,86%)	>0,05
<i>I. butschlii</i>	1 (0,94%)	1 (0,41%)	2 (0,57%)	>0,05
<i>A. lumbricóides</i>	29 (27,35%)	17 (7,00%)	46 (13,18%)	<0,05**
<i>T. trichiuras</i>	26 (24,53%)	12 (4,93%)	38 (10,89%)	<0,01*
<i>Ancilostomídeo</i>	12(11,32%)	2 (0,82%)	14 (4,01%)	<0,01*
<i>S. stercoralis</i>	2 (1,88%)	4 (1,65%)	6 (1,72%)	>0,05
Leveduras	2 (1,88%)	3 (1,23%)	5 (1,43%)	>0,05

Teste Binomial

* Altamente significativa

** Significante

Com relação à presença de parasitos por faixa etária foi observada a frequência dos enteroparasitas nos grupos diarreico e não diarreico entre as faixas etárias acima de 0 anos até os 10 anos ($p=0,5975$), não houve diferenças entre os grupos, como demonstrado na tabela 4.

Tabela 4. Frequência de enteroparasitas em indivíduos diarreicos e não diarreicos por faixa etária na população quilombola do Abacatal no período de abril de 2008 a setembro de 2010.

Idade/Anos	Enteroparasitas	
	Diarreico (n=66)	Não diarreico (n=206)
0-1	4 (6,06%)	5 (2,42%)
>1-5	25 (37,87%)	82 (39,8%)
>5-10	23 (34,84%)	70 (33,98%)
>10	14 (21,21%)	49 (23,78%)

Teste G de William, $p=0,5975$

Das 30 amostras fecais positivas para os agentes virais RVA, RVC e PBV, 86,66% (26/30) foram detectados no grupo diarreico enquanto que 23,33% (4/30) foram no grupo não diarreico. Os RVA e os PBV apresentaram maior frequência no grupo diarreico. Os pacientes apresentaram quadro clínico moderado em 73,33% dos casos, nos casos clínico leve em 16,66% e 10% apresentaram-se assintomático (tabela 5).

Com relação à associação entre vírus e parasitas, observou-se uma frequência de casos virais com infecção poli parasitária em 53,33% (16/30) e com quadro clínico moderado (73,33%; 22/30). Os RVA foram detectados em 91,66% do grupo diarreico com 45,83% (11/24) indivíduos poli infectados com enteroparasitas e apresentando quadro clínico moderado em 83,33% dos pacientes. O RVC foi detectado em apenas

uma amostra fecal do grupo diarreico e apresentando quadro clínico moderado e poli infectado com enteroparasitas. Os PBV foram detectados em 60% (3/5) no grupo diarreico e 40% no grupo não diarreico (2/5). Com relação à coinfeção, os PBV apresentaram 80% (4/5) associados com poli parasitária e 20% (1/5) mono parasitária e com o quadro clínico normal ou assintomático (40%), leve (40%) e moderado (20%) como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5. Associação entre as infecções virais e parasitárias e aspectos clínicos dos pacientes da comunidade quilombola do Abacatal no período de abril de 2008 a setembro de 2010.

Agentes virais	Infecção parasitária					Grupo		Quadro Clínico		
	Mono	Poli	Neg	Não testado		Diarreico (n=66)	Não Diarreico (n=206)	Normal	Leve	Moderado
RVA	4	11	5	4		22 (p=0,3)*	2 (p=0,01)*	1	3	20
RVC	0	1	0	0		1	0	0	0	1
PBV	1	4	0	0		3(p=0,004)**	2(p=0,001)**	2	2	1

Teste G de Williams, p=0,67

Teste Binomial, *p=0,0001, **p=0,03

Frequências de vômito, febre e dor abdominal foi de 41,5%, 46,3% e 58,5% em crianças com diarreia, respectivamente, enquanto que as crianças não diarreicas mostraram 5%, 3,4% e 30,5% destes sintomas, com um valor estatisticamente significativo (Tabela 6).

Com relação ao aleitamento materno 70 (70/177; 39,54%) crianças na faixa etária de 0-3 anos idade receberam o aleitamento materno de forma não exclusiva.

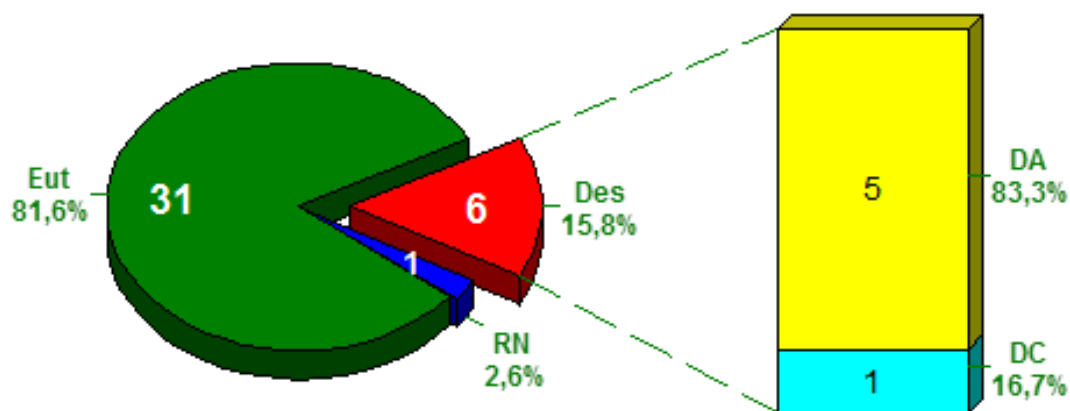
Tabela 6. Sintomas clínicos das crianças da comunidade quilombola do Abacatal.

Sintomas	Diarreico		Não diarreico, mas sintomático.		p-valor
	(n=41)	%	(n=59)	%	
Vômito	17	41,5	3	5,0	0,0008
Anorexia	25	61,0	21	35,6	0,1847
Febre	19	46,3	2	3,4	0,0001
Dor abdominal	24	58,5	18	30,5	0,1146
Náuseas	7	17,1	6	10,2	0,5597

Teste Qui-quadrado de partição

O presente estudo incluiu a avaliação nutricional de 38 crianças de 0-10 anos, de ambos os sexos, sendo 31/38 (81,6%) classificadas como eutróficas e 7/38 (18,4%) como desnutridas. Destas, 1/7 (14,3%) apresentaram risco nutricional, 5/7 (71,4%) desnutrição aguda grave, e 1/7 (14,3%) desnutrição crônica (Figura 19).

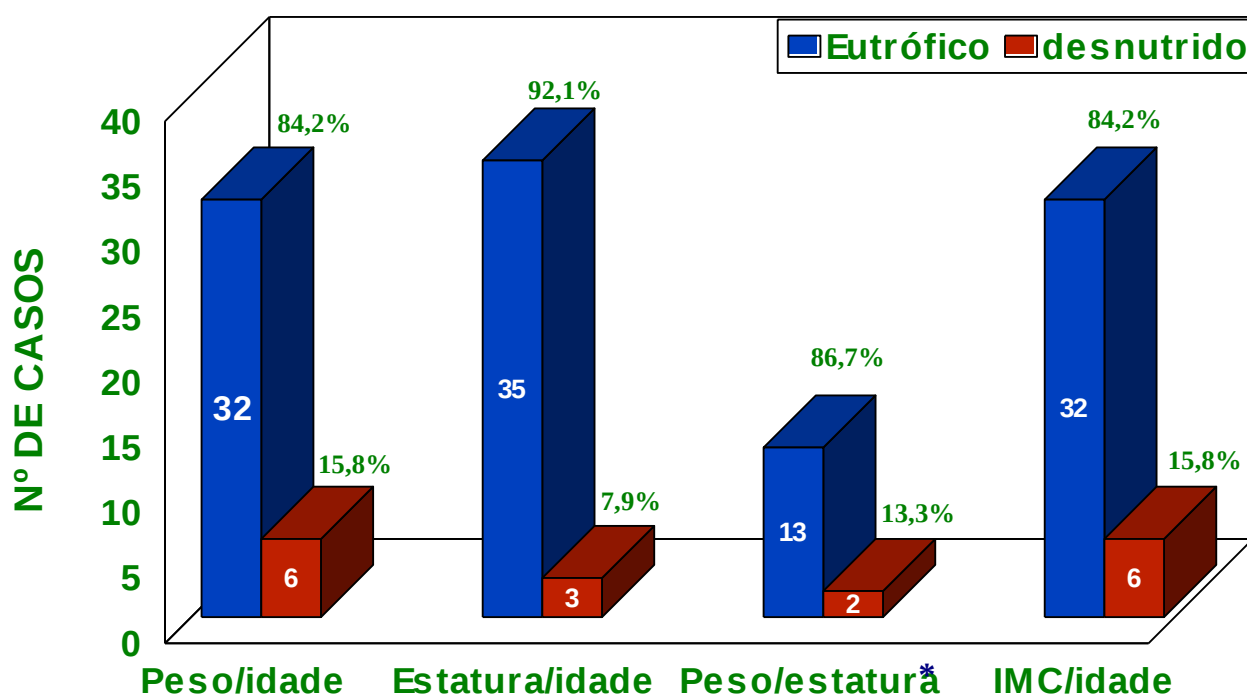
Figura 19. Distribuição do estado nutricional nas crianças avaliadas da Comunidade Quilombola do Abacatal, Ananindeua, PA.



Eut: Eutrófico; Des: Desnutridos; RN: Risco nutricional; DA: Desnutrição aguda; DC: Desnutrição crônica

No que diz respeito aos indicadores peso/idade e IMC/idade, 32 crianças (84,2%) apresentaram-se eutróficas e seis (15,8%) desnutridas. Com relação a estatura/idade 35 crianças (92,1%) apresentaram-se eutróficas e três (7,9%) desnutridas. Já para o parâmetro peso/estatura 13 crianças (86,7%) eram eutróficas e duas (13,3%) desnutridas (Figura 20).

Figura 20. Distribuição do estado nutricional de acordo com os indicadores antropométricos: peso/idade, estatura/idade, peso/estatura e IMC/idade nas crianças da Comunidade Quilombola do Abacatal, Ananindeua, PA.



* Crianças menores de cinco anos

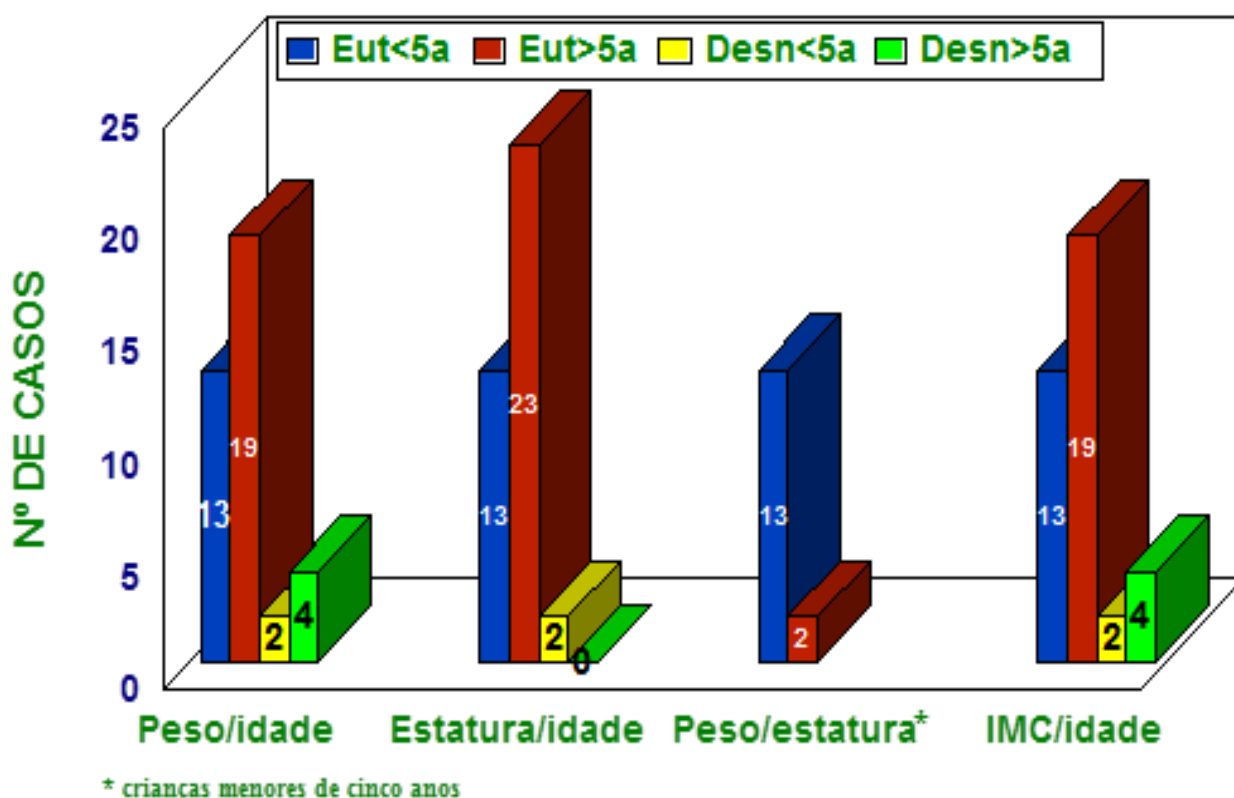
Das 38 crianças analisadas nos parâmetros peso/idade e IMC/idade foram encontradas: 13 crianças eutróficas menores de cinco anos e 19 maiores de cinco

anos. Entre as desnutridas, duas eram menores de cinco anos e quatro, acima de cinco anos (Figura 21).

No parâmetro estatura/idade, apenas duas crianças menores de cinco anos apresentaram estatura abaixo da esperada para a idade. As demais analisadas apresentaram estatura adequada para a idade.

O parâmetro peso/estatura é utilizado somente em crianças menores de cinco anos e mostrou que 13 crianças eram eutróficas e duas desnutridas.

Figura 21. Distribuição do estado nutricional de acordo com os indicadores antropométricos: peso/idade, estatura/idade, peso/estatura e IMC/idade em crianças menores e maiores de cinco anos residentes na Comunidade Quilombola do Abacatal,



Eut < 5a (Eutróficos com menos de 5 anos) Eut > 5a (Eutróficos com mais de 5 anos)

Desn < 5a (Desnutrido com menos de 5 anos) Desn > 5a (Desnutrido com mais de 5 anos)

6.3 Caracterização genotípica dos 11 segmentos dos Rotavírus do grupo A

No período de 2008 a 2010 foram coletados 375 amostras fecais sendo 112 de casos diarreicos e 263 de casos não diarreicos. O RVA foi detectado no período de 2008 em três amostras, enquanto que em 2009 apenas em uma amostra. Em 2010 ocorreu um surto de diarreia que acometeu 39,37% (63/160) dos casos envolvendo adultos e crianças. Neste surto foram detectados 20 casos positivos para RVA dos quais 16 casos foram em pacientes diarreicos e 04 em não diarreicos (Tabela 7).

A tabela 7 demonstra a caracterização genotípica dos RVA ao longo deste estudo com a ocorrência dos genótipos G2P[4], G12P[6], G1P[8] e G3P[9]. Os genótipos G2P[4] e G12P6 apresentaram perfil curto enquanto que os genótipos G1P[8] e G3P[9] apresentaram perfil longo. No ano de 2010, as frequências dos genótipos G12P[6] e G1P[8] foram maiores no grupo diarreico, enquanto que a frequência do genótipo G3P[9] no grupo diarreico não foi significativa. Os genótipos G2P[4] e G1P[8] apresentaram-se associados a casos esporádicos e circularam nos anos de 2008 e 2009.

Tabela 7. Caracterização eletroferética e genotípica dos RVA genótipos G e P detectados em indivíduos com e sem diarreia na comunidade quilombola do Abacatal, no período de 2008 a 2010.

		2008 n=82			2009 n=133			2010 n=160		
Genotipagem dos RVA		Diarreico (n=38) Não diarreico (n=44)			Diarreico (n=11) Não diarreico (n=122)			Diarreico (n=63) Não diarreico (n=97)		
	EGPA			p-valor			p-valor			p-valor
G2P[4]	Perfil Curto	3	0	0,09	0	0	-	0	0	-
G12P[6]	Perfil Curto	0	0	-	0	0	-	7	1	0,006**
G1P[8]	Perfil Longo	0	0	-	1	0	0,08	4	1	0,05*
G3P[9]	Perfil Longo	0	0	-	0	0	-	5	2	0,08
Total		3	-	-	1	-	-	16	4	-

Teste Binomial para 2 proporções, $p \geq 0,05$

*Significante, **Altamente significativa

A tabela 8 demonstra o perfil genotípico dos RVA encontrados na população quilombola do Abacatal em relação à idade e ao quadro clínico. Todos os RVA foram provenientes de pacientes não vacinados. O genótipo G2P[4] acometeu três crianças menores de cinco anos de idade com quadro clínico moderado, enquanto que o

genótipo G12P[6] acometeu quatro crianças entre 5 a 10 anos de idade e quatro adultos, sendo um (1,25%) com quadro clínico leve e 7 (87,5%), moderado. Entretanto, o genótipo G1P[8] apresentou-se em todas as faixas etárias com 66% (4/6) com quadro moderado e 34% (2/6) com quadro clínico leve. O genótipo G3P[9] acometeu duas crianças menores de 10 anos e cinco adultos, destas seis apresentaram quadro clínico moderado, e um apresentou quadro clínico assintomático. Os RVA acometeram com maior frequência crianças entre 5 a 10 anos e adultos diarreicos com quadro moderado.

Tabela 8. Perfil genotípico dos RVA em associação com a idade e quadro clínico na população quilombola do Abacatal no período de 2008 a 2010.

		Grupo			Genótipos RVA				
		Diarreico (n=112)	Não diarreico (n=263)	p-valor	G2P[4]	G12P[6]	G1P[8]	G3P[9]	p-valor
Idade/ano	0-1	15	13	0,002	1	0	1	0	-
	1>5	47	87	0,05	2	0	2	1	0,773
	5>10	28	87	0,05	0	4	1	1	0,046*
	>10	22	76	0,03	0	4	2	5	0,003**
Quadro Clínico	Assinto- mático	33	255	<0,01	0	0	0	1	-
	Leve	28	6	<0,01	0	1	2	0	0,199
	Moderado	51	2	<0,01	3	7	4	6	0,0413*

Teste Binomial para 2 proporções

*Significativo

**Altamente significativo

Foram visitadas 25 casas ao longo do estudo. Com relação à infecção viral 13 núcleos familiares foram infectados por RVA, RVC e PBV. O paciente QUI-067, morador da casa 01, foi infectado por PBV genogrupo I em 05/04/2010 e RVA G3P[9] em 21/07/2010, enquanto que o paciente QUI-158, morador da casa 20 foi infectado com um intervalo de sete dias por PBV genogrupo I em 11/08/2010 e RVA G12P[6] em 18/08/2010. O paciente QUI-059, morador da casa 09, foi infectado por RVA G2P[4] em 09/10/2008 e G1P[8] em 16/08/2010. Foram colhidas e testadas duas amostras do paciente QUI-73 em 11/08/2010 e 18/08/2010, dos quais ambas foram positivas para o G12P[6] (Quadro 11).

O Quadro 11 demonstra que durante o ano de 2010 ocorreu um microsurto familiar causado por RVA. O genótipo G3P[9] acometeu residentes das casas 1, 3, 4, 5 e 21, o genótipo G1P[8] acometeu residentes das casas 9 e 11 e o genótipo G12P[6] acometeu residentes das casas 19 e 20.

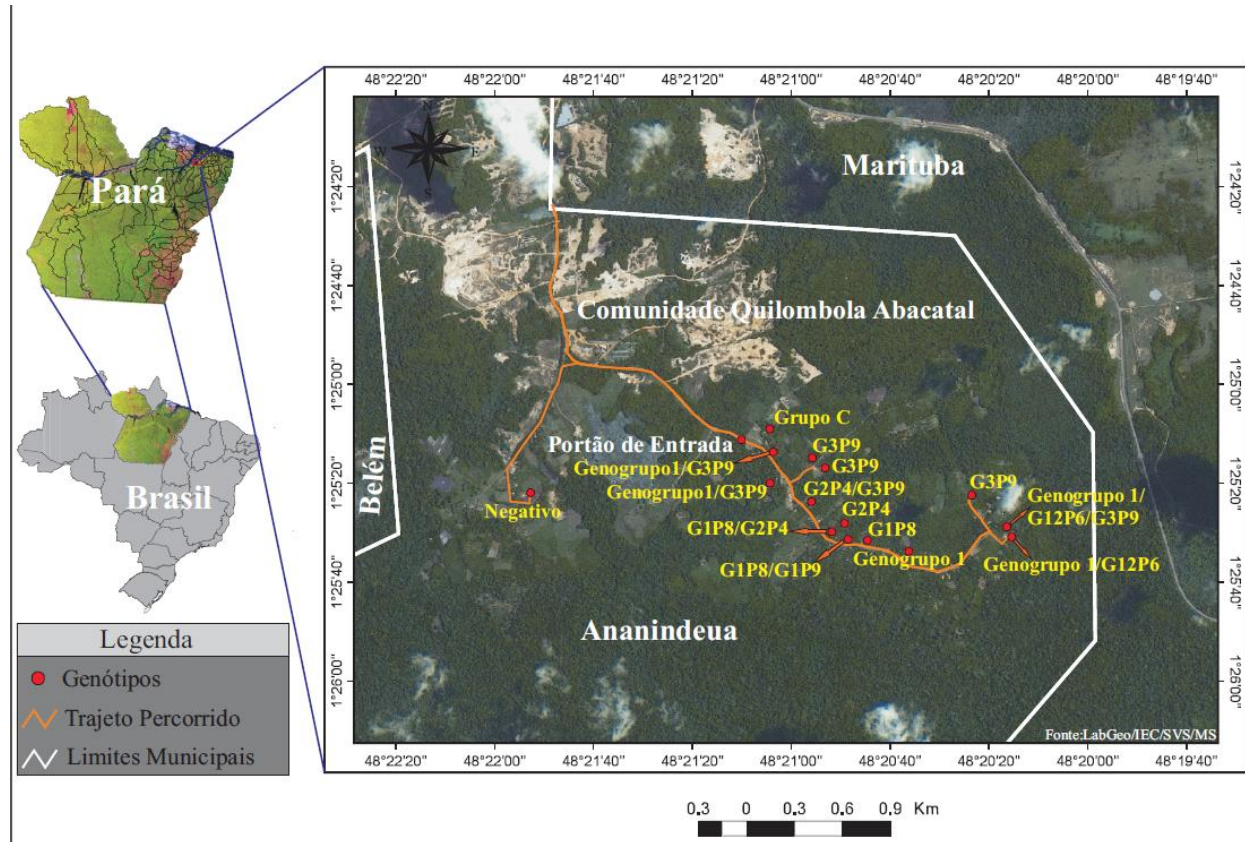
O genótipo G3P[9] ocorreu na ultima quinzena do mês julho de 2010, enquanto que os genótipos G1P[8] e G12P[6] ocorreram no mês de agosto de 2010.

A Figura 22 mostra o mapa da localização da comunidade quilombola do Abacatal, Ananindeua, Pará, Brasil e a distribuição geográfica difusa dos genótipos virais ao longo da comunidade.

Quadro 11. Relação das residências da comunidade quilombola do Abacatal acometidas por agentes virais durante o período de abril de 2008 a setembro de 2010.

Residência	Amostras	Idade /ano	Coleta fezes (dia/mês/ano)	Quadro Clínico	Agente viral	Genotipagem
Casa 03	QUI-026 F1	7	08/08/2008	Diarreico	PBV	Genogrupo1
Casa 08	QUI-036 F1	4	14/08/2008	Diarreico	RVA	G2 P[4]
Casa 09	QUI-059 F1	5	09/10/2008	Diarreico	RVA	G2 P[4]
Casa 10	QUI-060 F1	7	16/10/2008	Diarreico	RVA	G2 P[4]
Casa 13	QUI-063 F1	5	29/10/2008	Diarreico	RVC	Grupo C
Casa 24	QUI-108 F1	2	27/08/2009	Diarreico	RVA	G1 P[8]
Casa 01	QUI-067 F2	10	05/04/2010	Controle	PBV	Genogrupo1
Casa 01	QUI-067 F3	10	21/07/2010	Controle	RVA	G3 P[9]
Casa 01	QUI-015 F11	2	21/07/2010	Diarreico	RVA	G3 P[9]
Casa 01	QUI-139 F1	34	21/07/2010	Diarreico	RVA	G3 P[9]
Casa 03	QUI-135 F1	16	21/07/2010	Diarreico	RVA	G3 P[9]
Casa 04	QUI-146 F1	14	26/07/2010	Controle	RVA	G3 P[9]
Casa 05	QUI-035 F5	5	21/07/2010	Diarreico	RVA	G3 P[9]
Casa 21	QUI-140 F1	14	21/07/2010	Diarreico	RVA	G3 P[9]
Casa 09	QUI-150 F1	77	11/08/2010	Diarreico	RVA	G1 P[8]
Casa 09	QUI-059 F3	5	16/08/2010	Controle	RVA	G1 P[8]
Casa 11	QUI-089 F4	3	11/08/2010	Diarreico	RVA	G1 P[8]
Casa 11	QUI-151 F1	86	11/08/2010	Diarreico	RVA	G1 P[8]
Casa 11	QUI-152 F1	0,8	11/08/2010	Diarreico	RVA	G1 P[8]
Casa 15	QUI-056 F6	5	07/04/2010	Controle	PBV	Genogrupo1
Casa 19	QUI-130 F2	8	09/08/2010	Diarreico	RVA	G12 P[6]
Casa 19	QUI-154 F1	43	11/08/2010	Controle	RVA	G12 P[6]
Casa 19	QUI-153 F1	14	11/08/2010	Diarreico	PBV	Genogrupo1
Casa 20	QUI-074 F2	9	11/08/2010	Diarreico	RVA	G12 P[6]
Casa 20	QUI-157 F1	16	11/08/2010	Diarreico	RVA	G12 P[6]
Casa 20	QUI-073 F2	7	11/08/2010	Diarreico	RVA	G12 P[6]
Casa 20	QUI-158 F1	42	11/08/2010	Diarreico	PBV	Genogrupo1
Casa 20	QUI-158 F2	42	18/08/2010	Diarreico	RVA	G12 P[6]
Casa 20	QUI-073 F3	7	18/08/2010	Diarreico	RVA	G12 P[6]
Casa 20	QUI-164 F1	46	18/08/2010	Diarreico	RVA	G12 P[6]

Figura 22. Mapa da localização da comunidade quilombola do Abacatal, na região metropolitana do estado do Pará, Ananindeua, Brasil e a distribuição genotípica dos PBV, RVC e RVA.



Fonte: Laboratório de geoprocessamento / IEC / SVS / MS.

Errata: G1P9 lê-se G1P8.

O Quadro 12 demonstra um resumo da constelação genotípica dos RVA encontrados neste estudo. O genótipo G2P[4] apresentou sua classificação genotípica em G2-P[4]-I2-E2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-H2, o genótipo G12P[6] em G12-P[6]-I2-E2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-H2 e o G1P[8] em G1-P[8]-I1-E1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-H1. O genótipo G3P[9] apresentou duas constelações com diferenças no genótipo Mx do gene VP3 (G3-P[9]-I18-E3-R3-C3-M2-A19-N3-T3-H6 e G3-P[9]-I18-E3-R3-C3-M3-A19-N3-T3-H6).

Foi observado que onze amostras pertenceram à constelação DS-1-like (I2-R2-C2-M2-A2-N2-T1-E2-H2), sendo que oito apresentaram a combinação G12P[6] e três, G2P[4] e seis espécimes evidenciaram a constelação Wa-like (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1). As sete amostras relacionadas com o genogrupo AU1-like revelaram constelações genótípicas incomuns, uma vez que foi observado o genótipo H6 em todos os espécimes, além da primeira detecção dos genótipos I18 e A19 de rotavírus. Em quatro espécimes [QUI-015 (F11), QUI-139 (F1), QUI-140 (F1), QUI-146 (F1)] foi observada uma variante alélica para o gene VP3 (M2), como demonstrado no quadro 5.

A análise filogenética das amostras quilombolas foi agrupada nos dendogramas de acordo com seus genes estruturais e não estruturais como demonstrado nas Figuras 23 a 34.

As sequências de NSP1 e VP6 do genótipo G3P[9] mostraram identidades abaixo do valor de corte, quando comparadas com as sequências pertencentes aos genótipos RVA estabelecidos. A identidade do gene NSP1 variou de 48,5% a 66,6% de semelhança com 18 genótipos descritos. O valor de corte de identidade percentual para NSP1 é de 79%. Com relação ao gene VP6 a semelhança com 17 genótipos descritos variou de 58,5% a 78%. O valor de corte identidade percentual para VP6 é de 85% (dados não mostrados).

As sequências de NSP1 e VP6 do RVA humano/Human-wt/BRA/QUI-35-F5/2010/G3P[9] foram submetidas ao RCWG que confirmou a identificação de um novo genótipo A19 e I18 para os genes NSP1 e VP6, de acordo com as orientações de classificação e nomenclatura do grupo de rotavírus do grupo A. A Figura 28 demonstra o dendograma dos nucleotídeos dos genes NSP1 e VP6 do genótipo G3P[9] RVA.

Para o gene VP7 foram sequenciados os seguintes genótipos: 6 amostras G1, 3 amostras G2, 7 amostras G3 e 8 amostras G12 como demonstrado na Figura 20. As amostras G1 do presente estudo apresentaram similaridade nucleotídica entre si de 99-100% e quando comparadas com a cepa vacinal Rotarix[®] a similaridade variou de 97-100%.

Com relação ao tipo G2, as amostras agruparam com espécimes isolados no Brasil (AC121 SAL1920) e Bangladesh (MMC6) formando um grupo coeso sustentado

por *bootstrap* de 99. Tanto a similaridade nucleotídica quanto aminoacídica nesse grupo foi de 97-100%.

Para as amostras G3 observou-se que elas formaram um grupo isolado e foram 100% idênticas entre si. Elas demonstraram similaridades nucleotídica e aminoacídica entre um isolado da Tailândia (CMH222) de 91% e 87%, respectivamente.

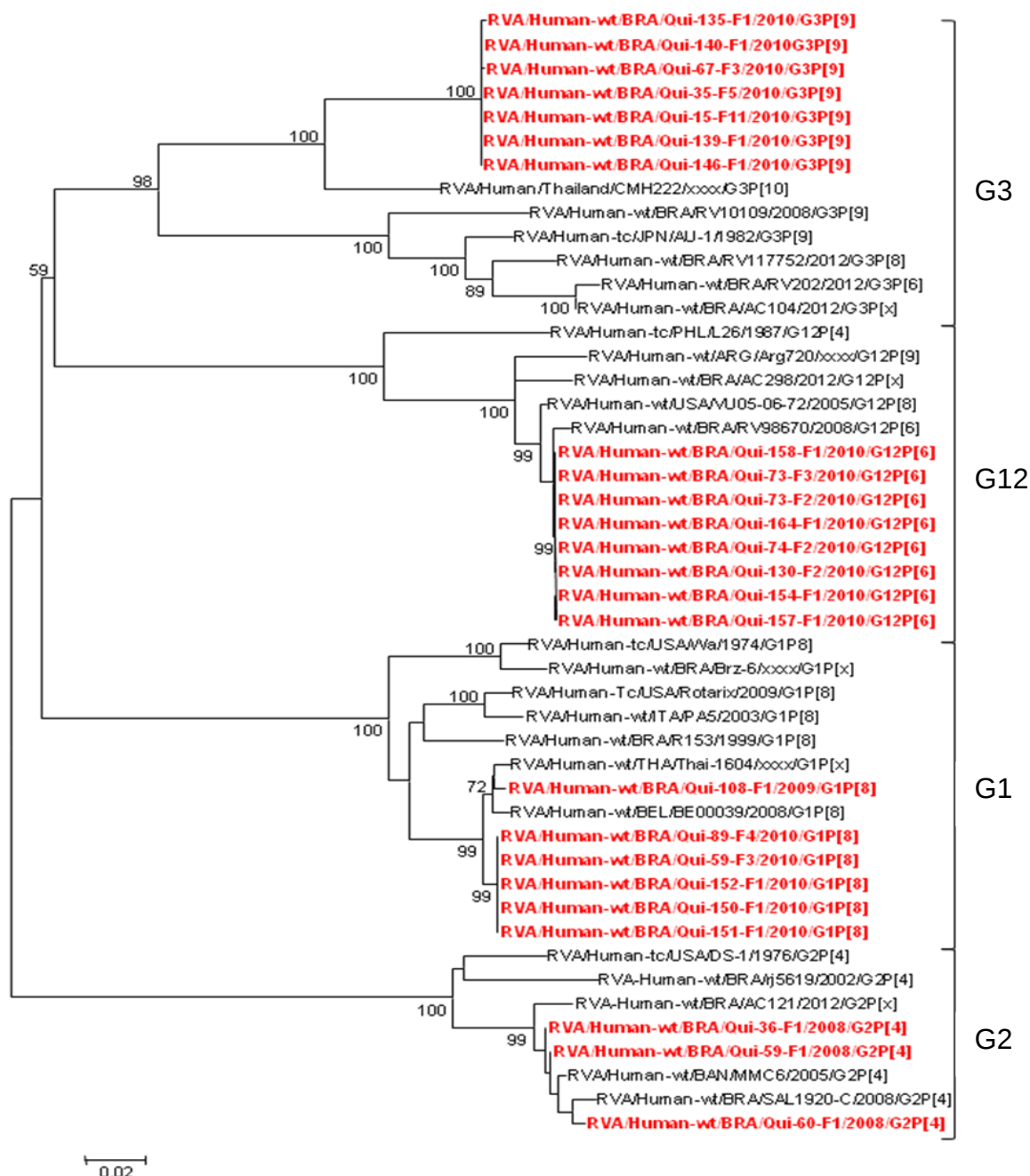
As amostras G12, assim como G3, foram 100% idênticas entre si e quando comparadas com uma amostra detectada no Brasil em 2008 (RV98670) apresentaram similaridade nucleotídica e aminoacídica de 89% e 72%, respectivamente.

Quadro 12. Resumo dos genótipos de RVA detectados nas amostras sob estudo correspondentes aos 11 segmentos gênicos.

	Registro	Data da colheita	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
	DS-1-like		G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
DS-1-like	QUI-036 (F1)	14/08/2008	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	QUI-059 (F1)	09/10/2008	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	QUI-060 (F1)	16/10/2008	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	QUI-073 (F2)	11/08/2010	G12	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	QUI-073 (F3)	18/08/2010	G12	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	QUI-074 (F2)	11/08/2010	G12	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	QUI-130 (F2)	09/08/2010	G12	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	QUI-154 (F1)	11/08/2010	G12	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	QUI-157 (F1)	11/08/2010	G12	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	QUI-158 (F2)	18/08/2010	G12	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	QUI-164 (F1)	18/08/2010	G12	P[6]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	Wa-like		G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
Wa-like	QUI-059 (F3)	16/08/2010	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	QUI-089 (F4)	11/08/2010	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	QUI-108 (F1)	27/08/2009	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	QUI-150 (F1)	11/08/2010	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	QUI-151 (F1)	11/08/2010	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	QUI-152 (F1)	11/08/2010	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	AU-1-like		G3	P[9]	I3	R3	C3	M3	A3	N3	T3	E3	H3
AU-1-like	QUI-015 (F11)	21/07/2010	G3	P[9]	I18	R3	C3	M2	A19	N3	T3	E3	H6
	QUI-035 (F5)	21/07/2010	G3	P[9]	I18	R3	C3	M3	A19	N3	T3	E3	H6
	QUI-067 (F3)	21/07/2010	G3	P[9]	I18	R3	C3	M3	A19	N3	T3	E3	H6
	QUI-135 (F1)	21/07/2010	G3	P[9]	I18	R3	C3	M3	A19	N3	T3	E3	H6
	QUI-139 (F1)	21/07/2010	G3	P[9]	I18	R3	C3	M2	A19	N3	T3	E3	H6
	QUI-140 (F1)	21/07/2010	G3	P[9]	I18	R3	C3	M2	A19	N3	T3	E3	H6
	QUI-146 (F1)	26/07/2010	G3	P[9]	I18	R3	C3	M2	A19	N3	T3	E3	H6

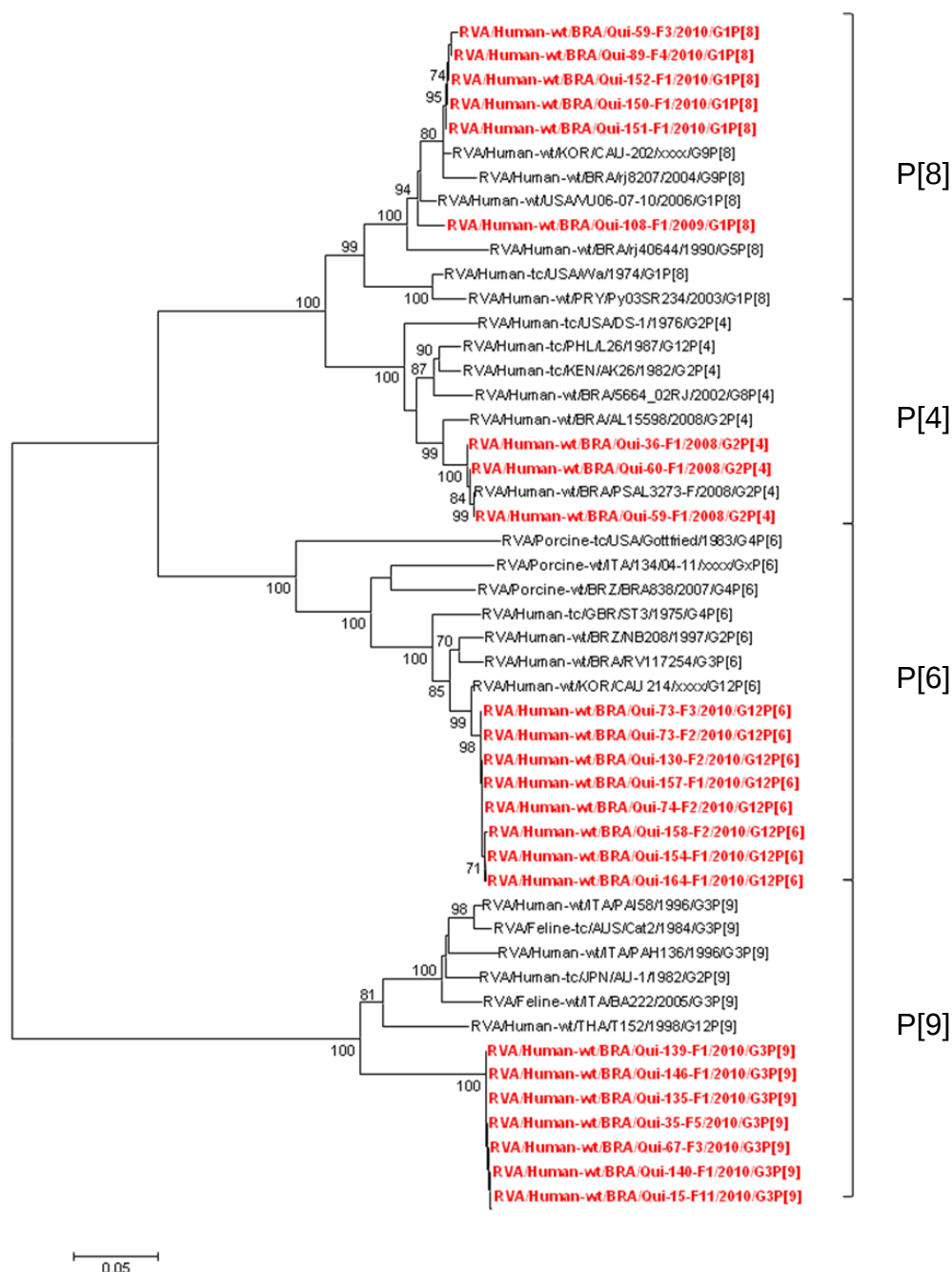
Constelações genotípicas dos RVA. Os genogrupos DS-1-like, Wa-like e AU-1-like são indicados pelas cores vermelho, verde e amarelo, respectivamente.

Figura 23. Dendograma baseado na sequência nucleotídica codificadora completa (1062PB) do gene VP7 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.



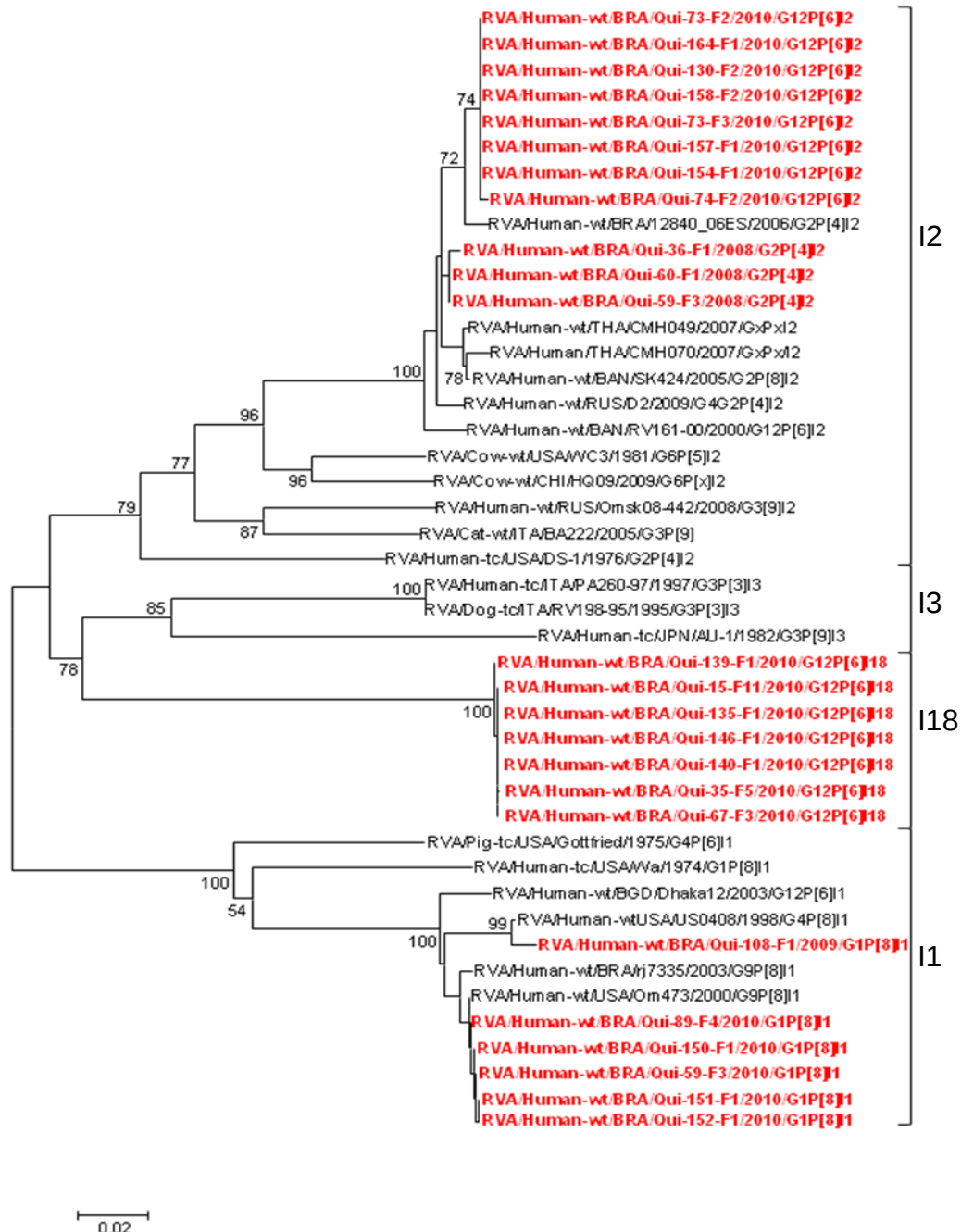
O dendograma foi construído pelo método de agrupamento de vizinhos (neigbon-joining), utilizando-se o modelo de kimura-2-parâmetros e teste não-paramétricos de Bootstrap com 2.000 réplicas. A escala é proporcional à distância genética. Os números acima e/ou abaixo dos ramos correspondem ao valor de Bootstrap. As amostras descritas neste estudo estão apresentadas em vermelho.

Figura 24. Dendograma baseado na sequência nucleotídica parcial (858pb) do gene VP4 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.



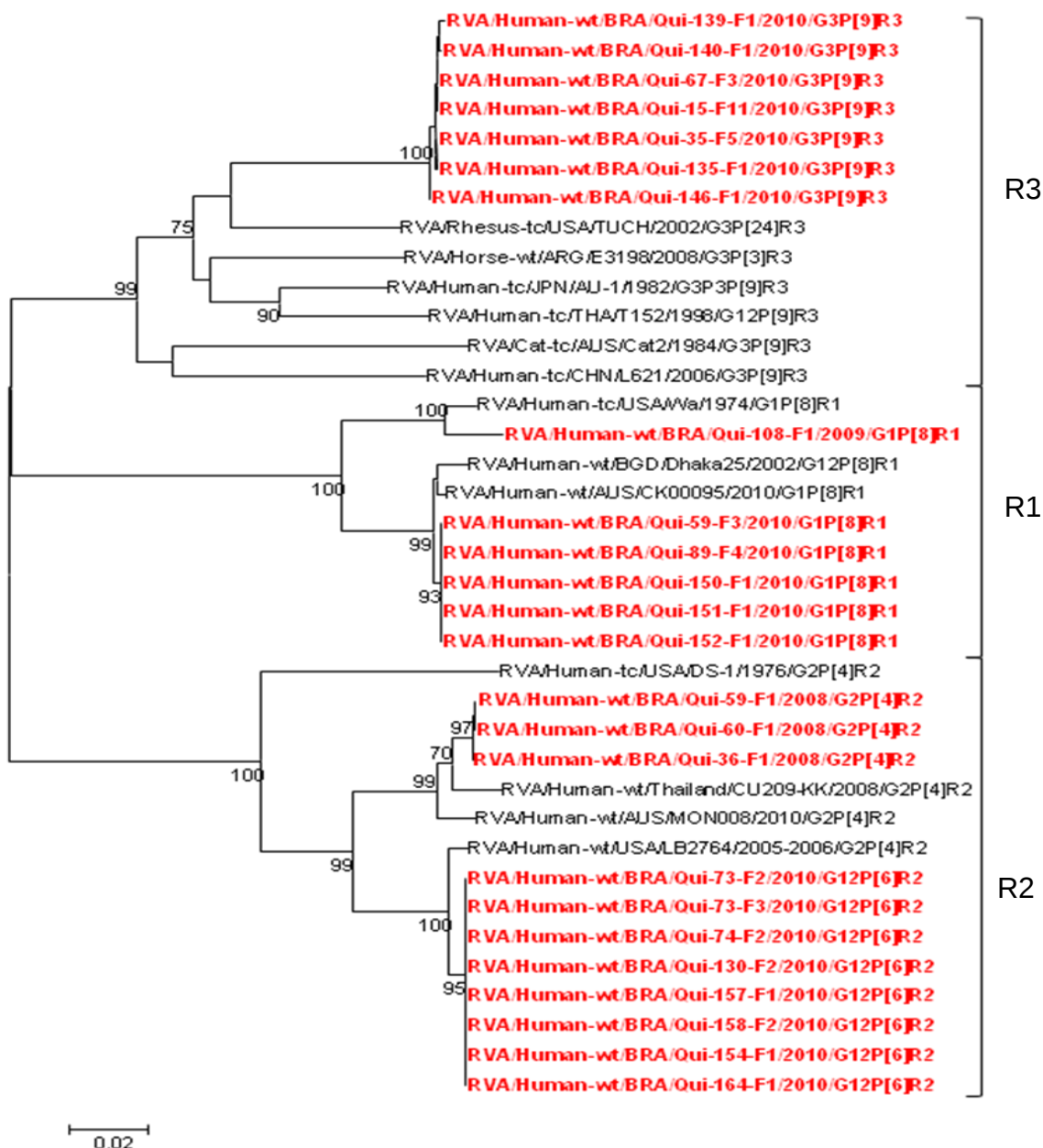
O dendograma foi construído pelo método de agrupamento de vizinhos (neigbon-joining), utilizando-se o modelo de kimura-2-parâmetros e teste não-paramétricos de Bootstrap com 2.000 réplicas. A escala é proporcional à distância genética. Os números acima e/ou abaixo dos ramos correspondem ao valor de Bootstrap. As amostras descritas neste estudo estão apresentadas em vermelho.

Figura 25. Dendograma baseado na sequência nucleotídica parcial (371pb) do gene VP6 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.



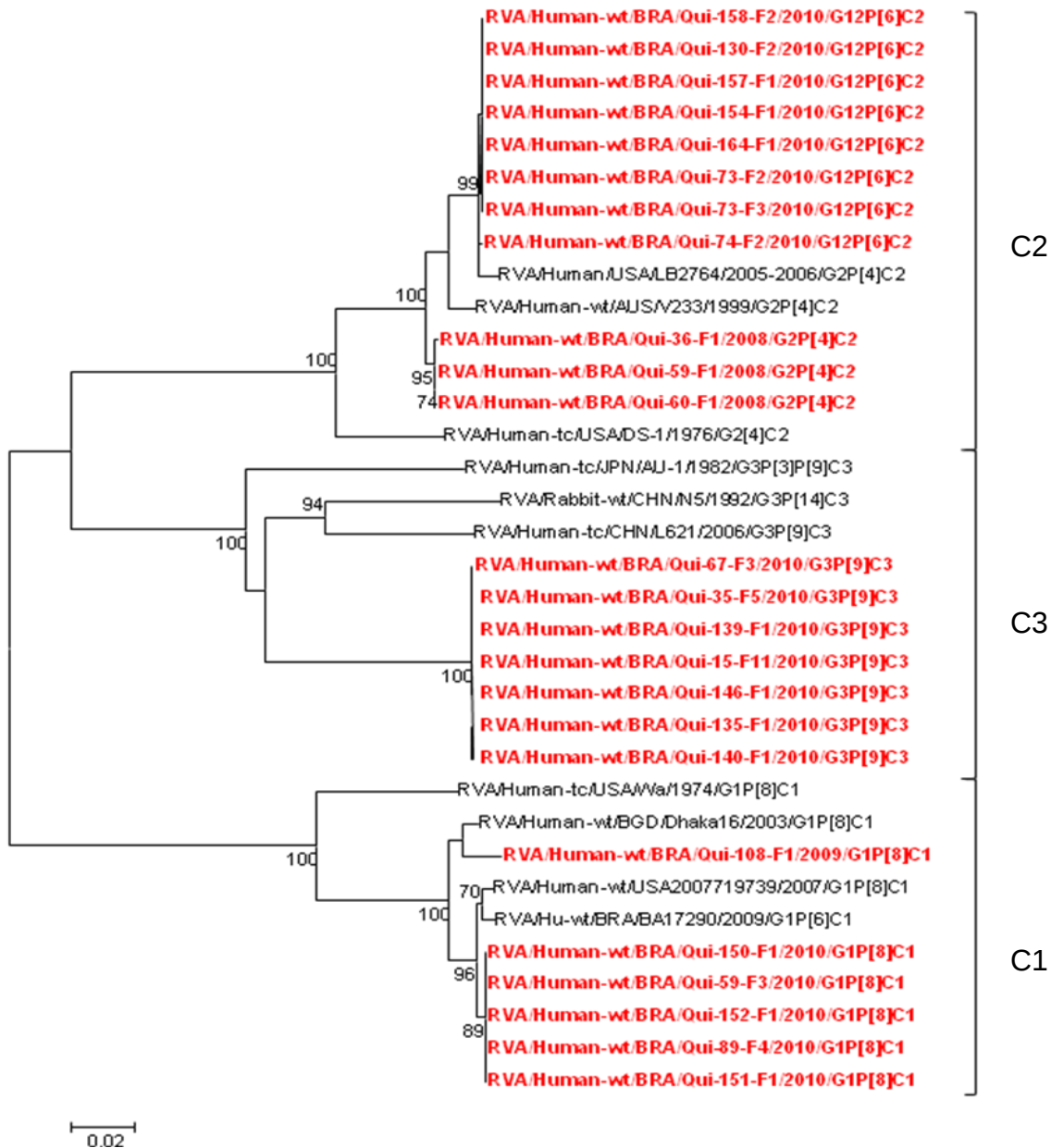
O dendograma foi construído pelo método de agrupamento de vizinhos (neigbon-joining), utilizando-se o modelo de kimura-2-parâmetros e teste não-paramétricos de Bootstrap com 2.000 réplicas. A escala é proporcional à distância genética. Os números acima e/ou abaixo dos ramos correspondem ao valor de Bootstrap. As amostras descritas neste estudo estão apresentadas em vermelho.

Figura 26. Dendograma baseado na sequência nucleotídica parcial (653pb) do gene VP1 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.



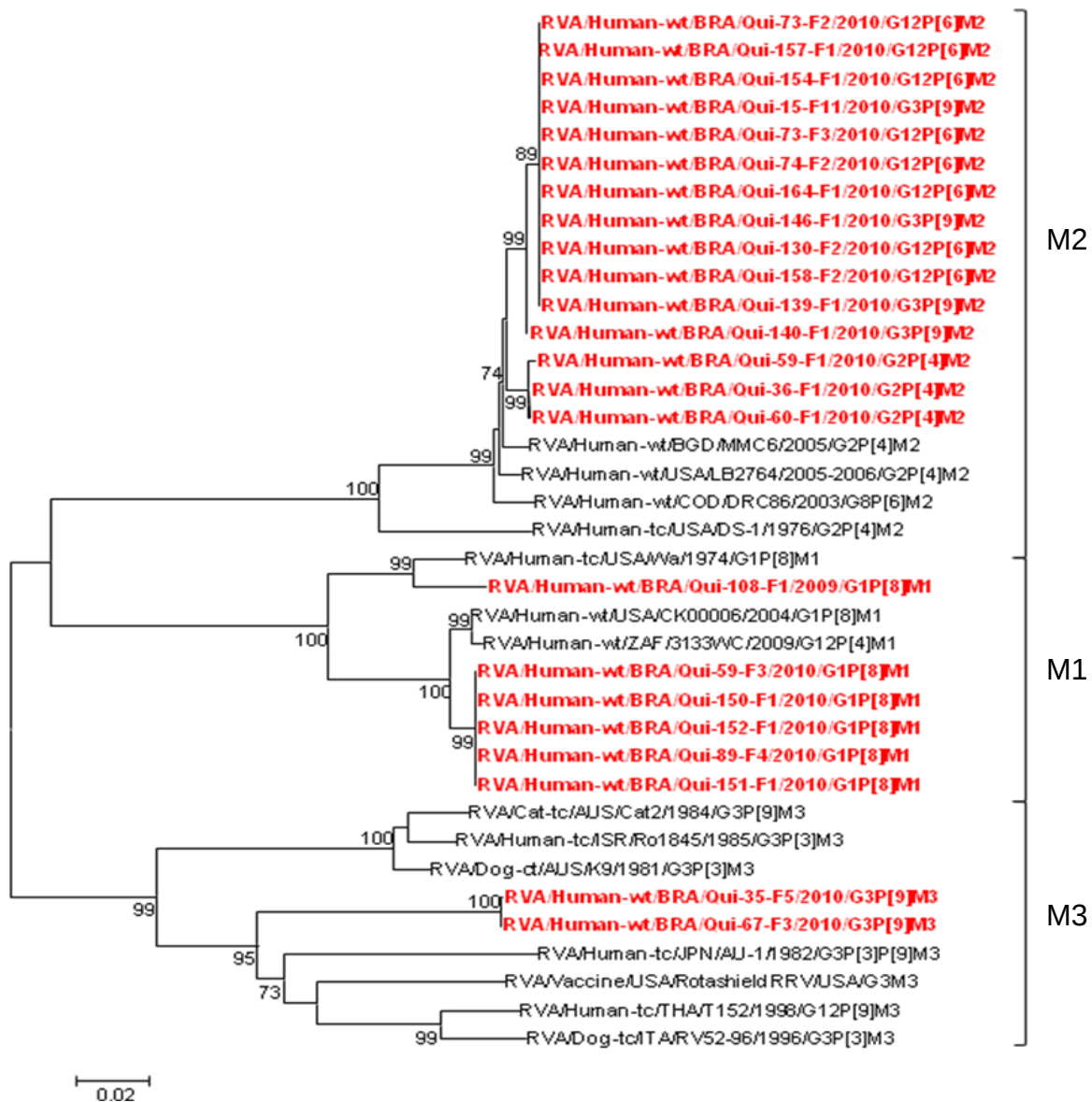
O dendograma foi construído pelo método de agrupamento de vizinhos (neigbon-joining), utilizando-se o modelo de kimura-2-parâmetros e teste não-paramétricos de Bootstrap com 2.000 réplicas. A escala é proporcional à distância genética. Os números acima e/ou abaixo dos ramos correspondem ao valor de Bootstrap. As amostras descritas neste estudo estão apresentadas em vermelho.

Figura 27. Dendograma baseado na sequencia nucleotídica parcial (C1, 662pb; C2, 623pb; C3, 647pb) do gene VP2 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.



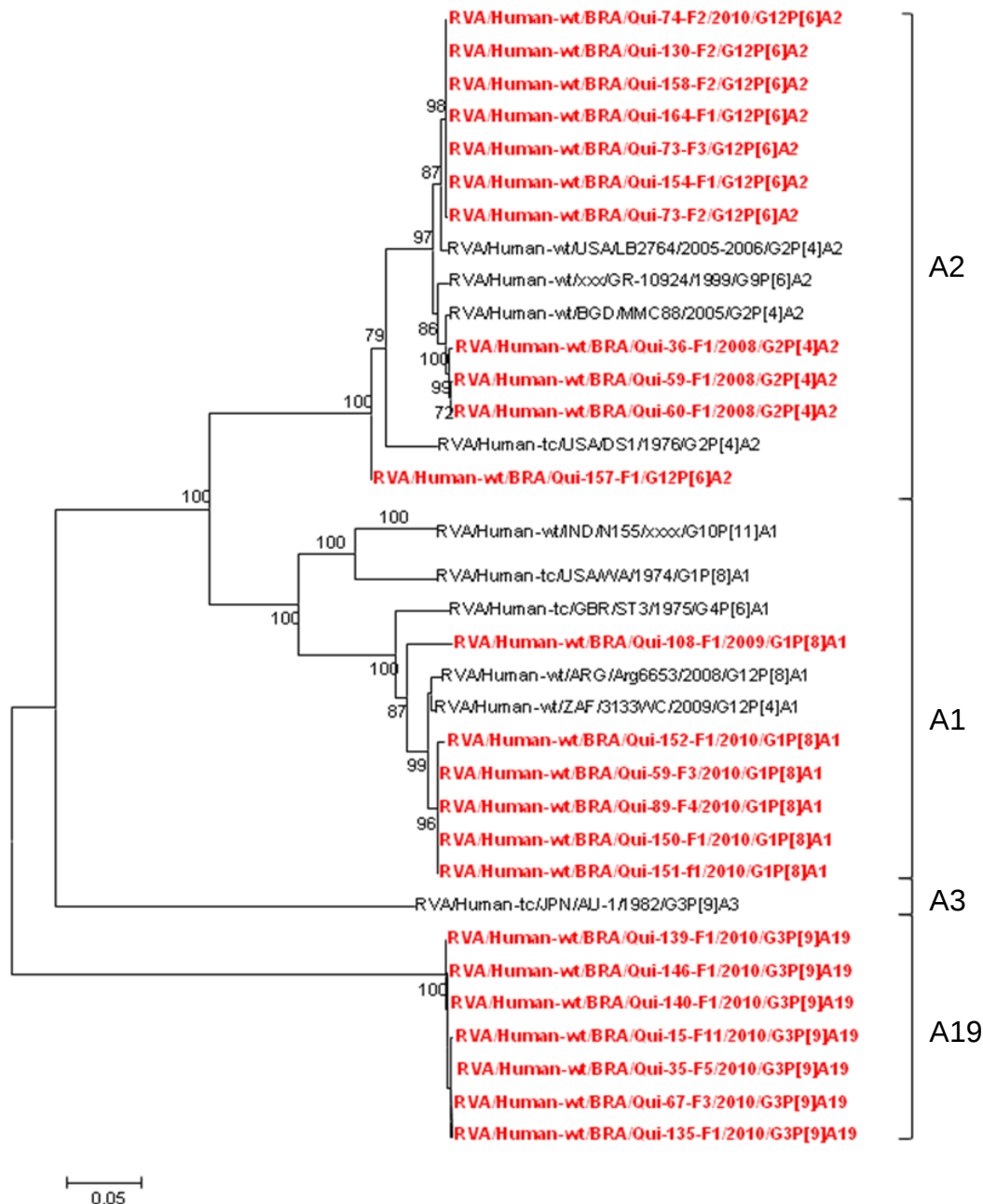
O dendograma foi construído pelo método de agrupamento de vizinhos (neighbor-joining), utilizando-se o modelo de kimura-2-parâmetros e teste não-paramétricos de Bootstrap com 2.000 réplicas. A escala é proporcional à distância genética. Os números acima e/ou abaixo dos ramos correspondem ao valor de Bootstrap. As amostras descritas neste estudo estão apresentadas em vermelho.

Figura 28. Dendograma baseado na sequência nucleotídica parcial (629pb) do gene VP3 de 23 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.



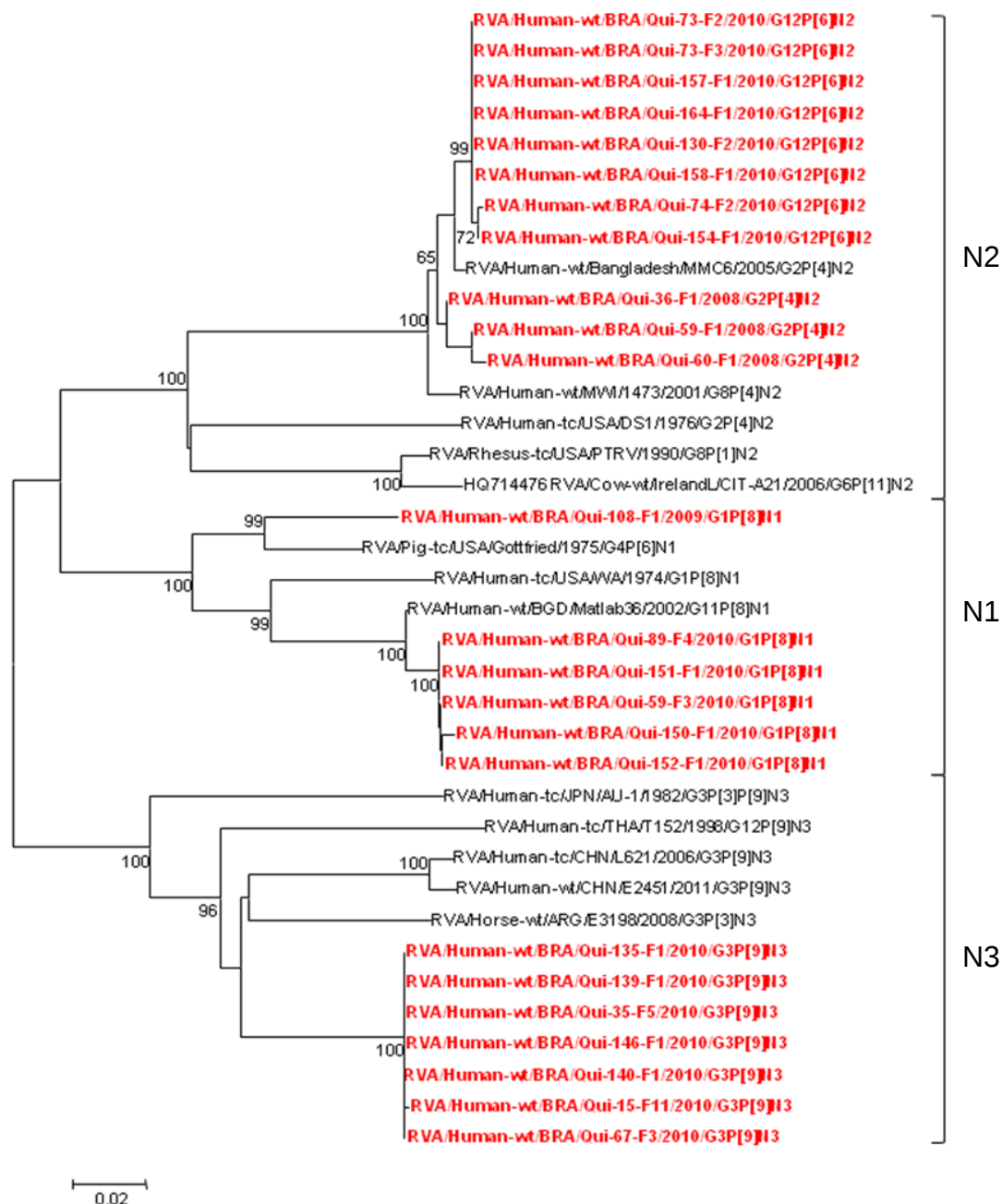
O dendograma foi construído pelo método de agrupamento de vizinhos (neigbon-joining), utilizando-se o modelo de kimura-2-parâmetros e teste não-paramétricos de Bootstrap com 2.000 réplicas. A escala é proporcional à distância genética. Os números acima e/ou abaixo dos ramos correspondem ao valor de Bootstrap. As amostras descritas neste estudo estão apresentadas em vermelho.

Figura 29. Dendograma baseado na sequência nucleotídica completa (1565pb) do gene NSP1 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.



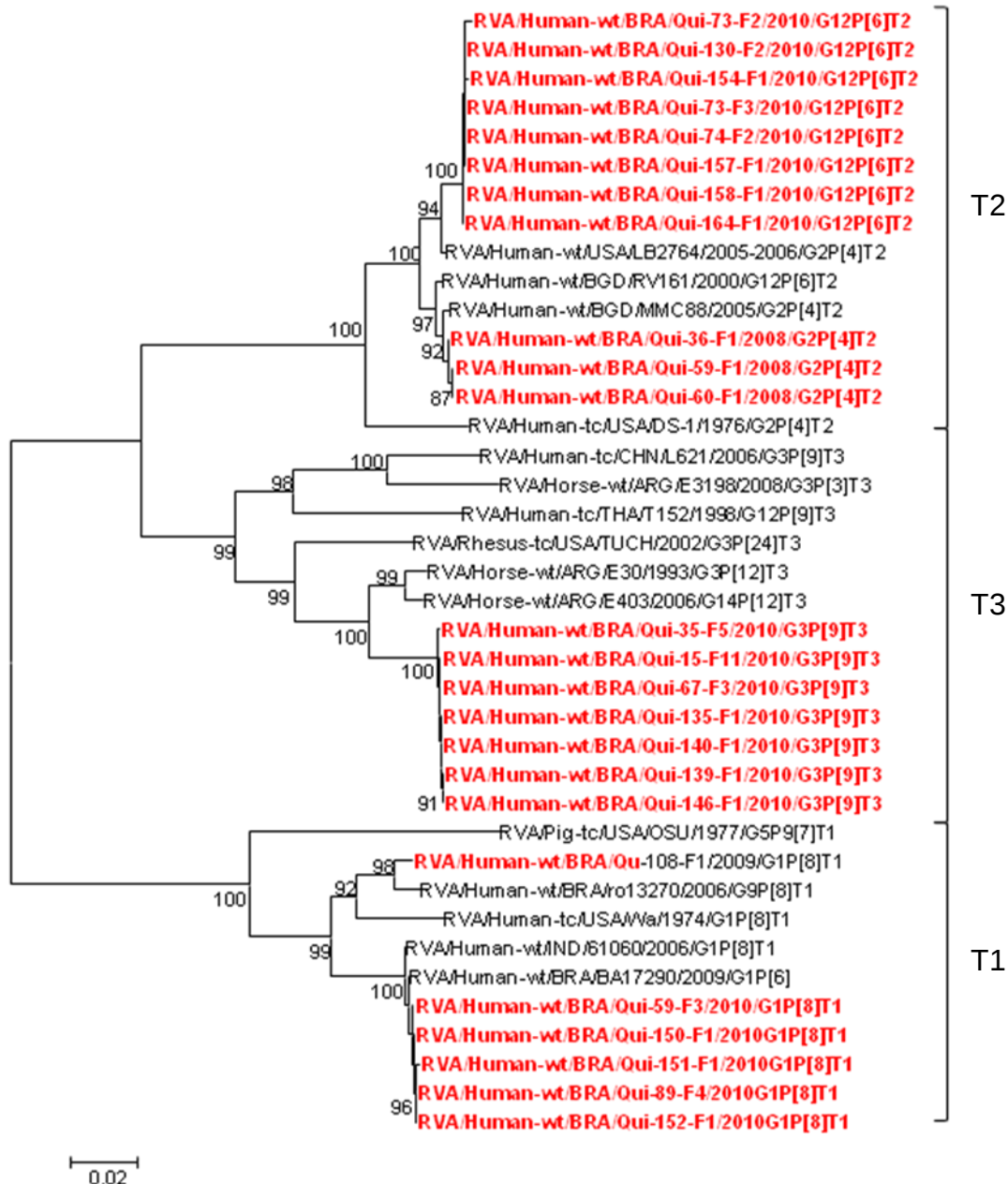
O dendograma foi construído pelo método de agrupamento de vizinhos (neigbon-joining), utilizando-se o modelo de kimura-2-parâmetros e teste não-paramétricos de Bootstrap com 2.000 réplicas. A escala é proporcional à distância genética. Os números acima e/ou abaixo dos ramos correspondem ao valor de Bootstrap. As amostras descritas neste estudo estão apresentadas em vermelho.

Figura 30. Dendograma baseado na sequência nucleotídica completa (1038pb) do gene NSP2 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.



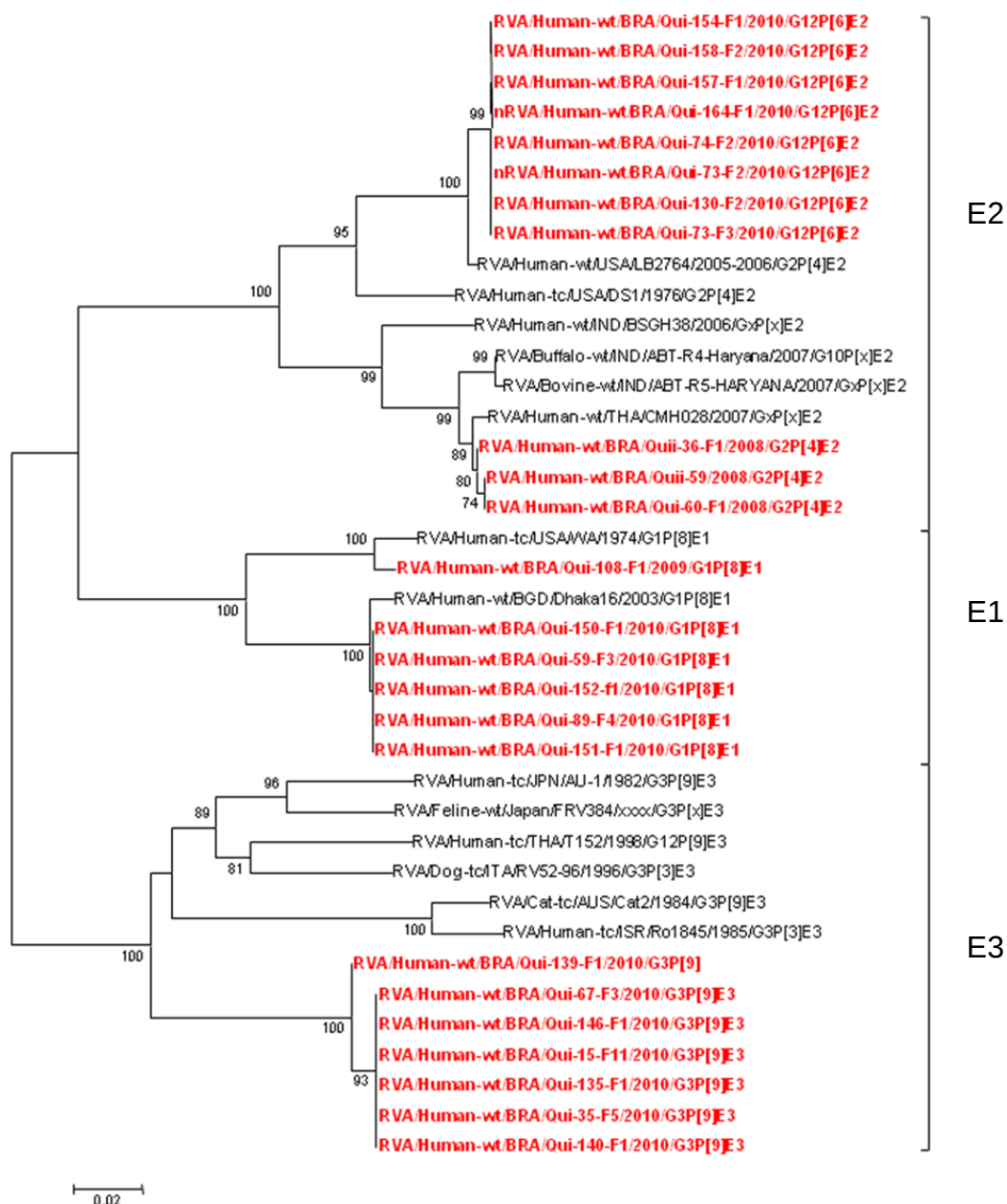
O dendograma foi construído pelo método de agrupamento de vizinhos (neigbon-joining), utilizando-se o modelo de kimura-2-parâmetros e teste não-paramétricos de Bootstrap com 2.000 réplicas. A escala é proporcional à distância genética. Os números acima e/ou abaixo dos ramos correspondem ao valor de Bootstrap. As amostras descritas neste estudo estão apresentadas em vermelho.

Figura 31. Dendograma baseado na sequência nucleotídica completa (1062pb) do gene NSP3 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.



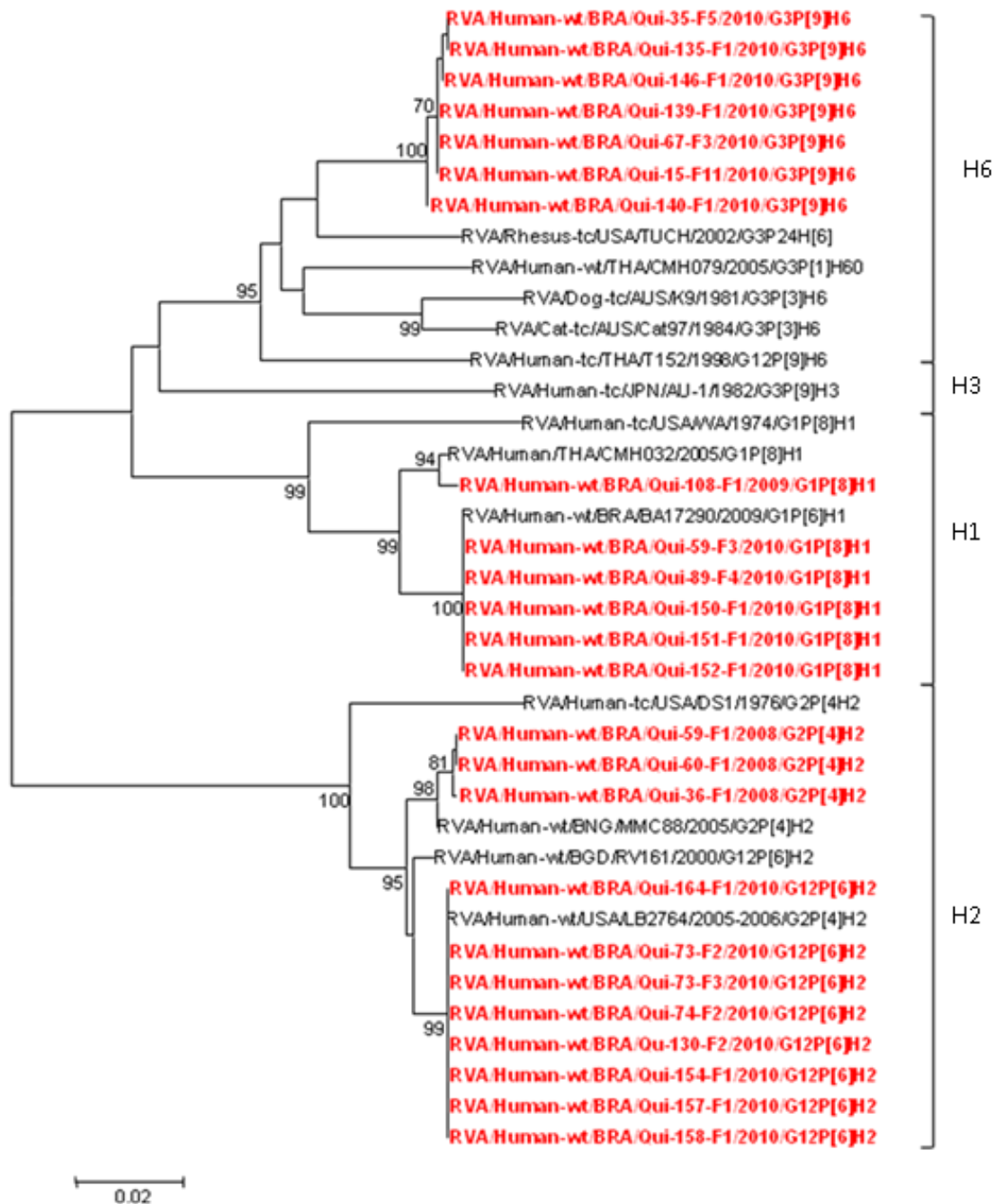
O dendograma foi construído pelo método de agrupamento de vizinhos (neigbon-joining), utilizando-se o modelo de kimura-2-parâmetros e teste não-paramétricos de Bootstrap com 2.000 réplicas. A escala é proporcional à distância genética. Os números acima e/ou abaixo dos ramos correspondem ao valor de Bootstrap. As amostras descritas neste estudo estão apresentadas em vermelho.

Figura 32. Dendograma baseado na sequência nucleotídica completa (738pb) do gene NSP4 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.



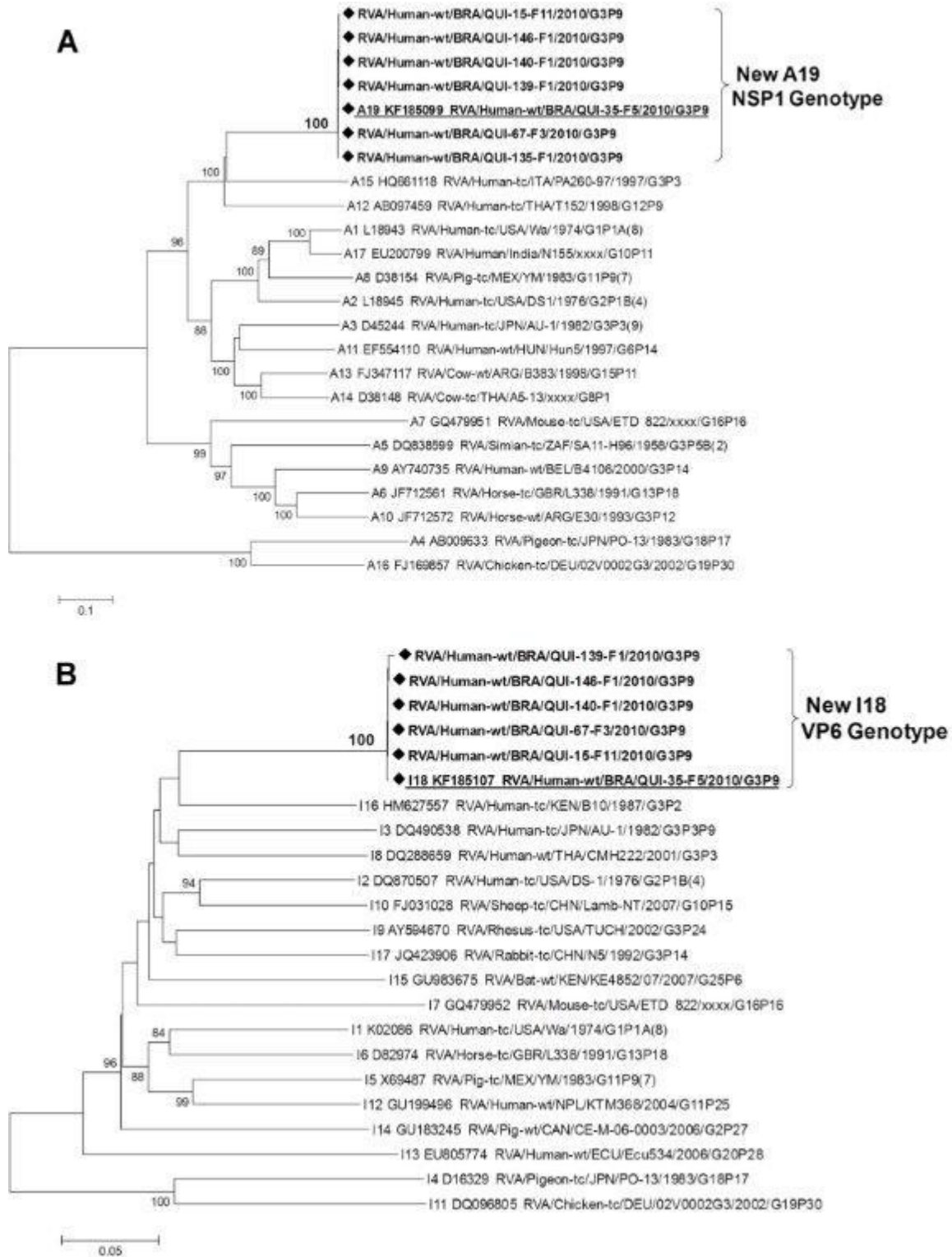
O dendograma foi construído pelo método de agrupamento de vizinhos (neigbon-joining), utilizando-se o modelo de kimura-2-parâmetros e teste não-paramétricos de Bootstrap com 2.000 réplicas. A escala é proporcional à distância genética. Os números acima e/ou abaixo dos ramos correspondem ao valor de Bootstrap. As amostras descritas neste estudo estão apresentadas em vermelho.

Figura 33. Dendograma baseado na sequência nucleotídica completa (664pb) do gene NSP5 de 24 cepas de RVA coletadas a partir de amostras fecais de residentes da comunidade quilombola do Abacatal, no período de abr/2008 a dez/2010.



O dendograma foi construído pelo método de agrupamento de vizinhos (neigbon-joining), utilizando-se o modelo de kimura-2-parâmetros e teste não-paramétricos de Bootstrap com 2.000 réplicas. A escala é proporcional à distância genética. Os números acima e/ou abaixo dos ramos correspondem ao valor de Bootstrap. As amostras descritas neste estudo estão apresentadas em vermelho.

Figura 34. Dendograma de nucleotídeos dos novos genótipos A19 e I18 dos genes NSP1 e VP6 de RVA



7 DISCUSSÃO

7.1 Detecção dos agentes virais

As taxas de prevalência global para RVA, RVC e PBV foram de 6,4%, 0,3% e 1,3%, respectivamente. Os dados sobre a ocorrência de outros vírus foram mostrados em um estudo realizado por Aragão *et al.* (2013), nesta mesma comunidade mostrando a frequência de norovírus, sapovírus e astrovírus em 19,7%, 2,5% e 1,2% dos casos, respectivamente, porém sendo detectada apenas em indivíduos diarreicos. Diferente dos nossos achados, Vicentini *et al.* (2013) não encontraram RVA ou RVC em um estudo realizado na Comunidade Quilombola de São Mateus e Conceição da Barra, na cidade Espírito Santo, região Sudeste do Brasil.

O RVA foi encontrado ao longo dos três anos de estudo evidenciando a circulação de RVA associado tanto a casos esporádicos quanto a surto de diarreia. A detecção de RVA no período de 2008 foi de 3,6% e 2009 foi de 0,77%. Em 2010, ocorreu um surto de diarreia que acometeu crianças e adultos com o aumento de frequência de 3,6% em 2008 para 12,5% em 2010. Nesse surto de 2010 foram detectados 20 casos de RVA, dos quais 16 foram diarreicos e 04 não diarreicos. Os RVA foram associados ao quadro clínico diarreico ($p=0,0001$). Contudo, ao associar o genótipo ao quadro clínico diarreico, apenas os genótipos G12P[6] e G1P[8] foram associados enquanto que o genótipo G3P[9] não apresentou resultado significativo ($p=0,08$).

7.2 Detecção dos agentes parasitários

Entre os parasitas encontrados neste estudo observou-se que os helmintos mais comuns foram *Ascaris lumbricoides* (13,18%) e *Trichuris trichiura* (10,89%), ao passo que entre os protozoários a *Entamoeba histolytica* (27,80%) e *Endolimax nana* (15,47%) foram predominantes. Em contraste, com o estudo realizado em uma

comunidade quilombola localizada na cidade de Espírito Santo, Brasil, conduzido por Damazio *et al.* (2013), os ancilostomídeos foram mais frequentes (14,6%), enquanto que a *Entamoeba histolytica/dispar* e *Endolimax nana* foram detectados em uma frequência mais baixa de 8,5% e 4,9%, respectivamente. Essa diversidade também foi encontrada por Cabral-Miranda *et al.*, (2010) e Andrade *et al.*, (2011) com a ocorrência de parasitos intestinais em comunidade quilombola localizada no Estado da Bahia e Minas Gerais, Brasil, respectivamente.

7.3 Aspectos epidemiológicos das infecções virais e parasitárias

7.3.1 Aspectos epidemiológicos das infecções virais

O RVA foi detectado em 22 crianças com diarreia e entre duas crianças não diarreicas. O RVC foi detectado por PAGE e confirmado por RT-PCR em uma criança diarreica com cinco anos de idade.

A frequência de RVC no presente estudo foi baixa, contudo, o nosso resultado está de acordo com a baixa prevalência deste grupo de RV registrado em várias localidades, incluindo Belém, Pará, Brasil (Gabbay *et al.*, 1999; Gabbay *et al.*, 2008; Gouvea *et al.*, 1991; Luchs *et al.*, 2011; Nilsson *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 1983).

Neste estudo, o PVB foi detectado numa taxa global de 1,3%, sendo 2,7% em pacientes diarreicos e 0,7% entre os indivíduos assintomáticos. Esta é a primeira detecção de PBV numa comunidade semi-isolada e, portanto, não temos nenhum dado em comunidade similar para efeito de comparação, e apenas resultados relatados na Itália, Brasil, Índia e Argentina (Cascio *et al.*, 1996; Fregolente *et al.*, 2009; Ganesh *et al.*, 2011; Giordano *et al.*, 2011). Embora, os PBV tenham sido associados com diarreia leve a grave, em indivíduos imunocomprometidos os sintomas tendem a ser mais graves, e têm sido considerados patógenos oportunistas se associado a outros agentes virais entéricos. Nos seres humanos, esta patogenicidade é ainda questionável, uma vez que estes agentes têm sido detectados em indivíduos sintomáticos quanto assintomáticos. Neste estudo, o genogrupo I de PBV foi encontrado em indivíduos

sintomáticos e assintomáticos e associado com enteroparasitas com quadro clínico variando de normal a moderado (Tabela 5).

Dos RVA, RVC e PBV detectados (86,66%) ocorreu no grupo diarreico enquanto que 23,33%, no grupo não diarreico. Os pacientes apresentaram quadro clínico moderado em 73,33% dos casos, 16,66% nos casos clínicos leves e 10% eram assintomáticos.

A distribuição temporal de agentes virais associados ou não a casos de gastroenterite em crianças e adultos foi determinada. RVA foi observado durante os três anos de estudo tendo inicialmente sido detectado em 3,6% dos casos seguido de 0,77% em 2009. Já no período de 2010, houve o aparecimento de um surto causado por RVA envolvendo crianças e adultos durante julho a setembro, com uma taxa de positividade global de 12,5% sendo 16 pacientes com diarreia e quatro de indivíduos não diarreicos.

O surto causado por rotavírus ocorreu na comunidade nos meses de julho e agosto de 2010, período quente com baixo índice pluviométrico, propício para o aparecimento de infecções por RVA (Pereira, 1993). A caracterização genotípica dos RVA ao longo deste estudo foi realizada com o registro dos genótipos G2P[4], G12P[6], G1P[8] e G3P[9]. Os genótipos G2P[4] e G2P[6] apresentaram perfil curto enquanto que os genótipos G1P[8] e G3P[9] apresentaram perfil longo. As amostras Quilombolas G3P[9] surgiram em julho de 2010, sugerindo um surto autolimitado. Vale ressaltar que os adultos foram os mais acometidos e que todos os indivíduos infectados pelo G3P[9] apresentaram sintomas moderados, no entanto, esses resultados podem ter ocorrido por acaso, devido ao pequeno tamanho da amostra.

A vacinação contra o rotavírus foi introduzida no calendário de vacinação do MS a partir de 2006, mas das 20 crianças elegíveis, apenas três crianças foram imunizadas. Após a introdução da vacina Rotarix no calendário de vacinas, os índices de mortalidade de crianças com menos de um ano até cinco anos de idade vem diminuindo ao longo dos tempos (Lanzieri *et al.*, 2011, do Carmo *et al.*, 2011; Linhares e Justino, 2014). Contudo, a cobertura vacinal na população mundial proveniente da vacina Rotarix vem diminuindo a incidência dos genótipos G1P[8] (Leite *et al.*, 2008) e aumentando a incidência de DDA proveniente de cepas não usuais ou raras, o que

pode explicar o aparecimento das cepas G12P[6] e G3P[9] (Bányai *et al.*, 2011, Soares, 2011). Para o genótipo G3 a combinação mais comum foram o G3P[8] e G3P[4]. Além disso, a alta prevalência de G3P[8] e G3P[NT] foram encontrados na região sudeste do Brasil (Leite *et al.*, 2008), e cepas considerados como genótipos incomuns, como G3P[9], G3P[6] e G3P[3] (Leite *et al.*, 2008; Luchs *et al.*, 2012).

Todas as amostras RVA são provenientes de pacientes não vacinados. O genótipo G2P[4] acometeu crianças menores de 5 anos de idade com quadro clínico moderado, enquanto que o genótipo G12P[6], crianças entre 5 a 10 anos de idade e adultos com 1,25% apresentando quadro clínico leve e 87,5%, moderado. O genótipo G1P[8] apresentou-se em todas as faixas etárias com 66% com quadro moderado seguido de 34% com quadro clínico leve. O genótipo G3P[9] acometeu crianças menores de 10 anos e adultos com quadro clínico moderado. Vale registrar que apenas um paciente apresentava-se assintomático.

As crianças envolvidas no surto causado por RVA não eram vacinadas o que pode explicar a manutenção do genótipo G1P[8] nesta comunidade em 2009 e 2010.

Silva *et al.*(1984) e Freitas *et al.* (1987) relataram os primeiros casos de microsurto familiares de RVA em Belém, Pará, porém o diagnóstico dos mesmos foi feito utilizando técnicas sorológicas. Durante o ano de 2010 a ocorrência de um surto de DDA acometeu 10 núcleos familiares desta comunidade. Este surto foi dividido em três microsurto. Os genótipos de RVA envolvidos foram o G1P[8], o G12P[6] e o G3P[9] os quais acometeram 9 núcleos familiares residentes nas proximidades como demonstrado no Quadro 11. Os microsurto familiares associados ao RVA tiveram localizações pontuais como demonstrado na Figura 19. Esta aproximação e o contato familiar corroboram com a transmissão oral/fecal por contaminação de alimentos, água ou utensílios domésticos (Gray *et al.*, 2008; Levy *et al.*, 2009; Okoh *et al.*, 2010). Estes microsurto foram autolimitados e de quadro clínico moderado.

A constelação genotípica dos RVA foi realizada e as amostras G1P[8] apresentaram a constelação Wa-like (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1), enquanto que os genótipos G2P[4] e G12P[6] apresentaram a constelação DS-1-like

G2-P[4]-I2-E2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-H2 e G12-P[6]-I2-E2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-H2, G1P[8], respectivamente. A análise filogenética de todos os genótipos G1P[8], G2P[4] e G12P[6] mostraram pequenas diferenças nucleotídicas entre os genótipos por período de coleta, o que demonstra a variabilidade genética dos RVA ao longo dos anos.

O genótipo G3P[9] apresentou duas constelações com diferença no genótipo Mx do gene VP3 (G3-P[9]-I18-E3-R3-C3-M2-A19-N3-T3-H6 e G3-P[9]-I18-E3-R3-C3-M3-A19-N3-T3-H6). Em quatro espécimes [QUI-015 (F11), QUI-139 (F1), QUI-140 (F1), QUI-146 (F1)] foi observada o genótipo M2 para o gene VP3. As sete amostras relacionadas com o genogrupo AU1-like revelaram constelações genotípicas incomuns, uma vez que foi observado o genótipo H6 em todos os espécimes, além da primeira detecção dos genótipos I18 e A19 de rotavírus. Os genes VP1, VP2, VP3 e NSP3 são de origem animal o que sugere uma reestruturação interespecie. O gene VP6 se alinhou com pouca similaridade ao genótipo I16.

Para o genótipo G3 a combinação mais comum é a G3P[8] e G3P[4]. Além disso, a alta prevalência de G3P[8] e G3P[NT] foi encontrada na região sudeste do Brasil, e cepas consideradas genótipos incomuns, como G3P[9], G3P[6] e G3P[3] (Leite *et al.*, 2008, Luchs *et al.*, 2012).

O genótipo G3P[9] é uma cepa mundialmente rara com uma prevalência de <0,2% e pode ter origem felina/canina, ou derivar de múltiplos eventos recombinantes envolvendo rotavírus de origem canina, felina e humana (Bányai *et al.*, 2012). Além disso, a prevalência do G3P[9] no Brasil é elevada no estado do Rio de Janeiro (Santos *et al.*, 2003; Benati *et al.*, 2010) e aparentemente raro na região amazônica como demonstrado em um estudo conduzido em Belém, Pará, entre 1992-2006, em que somente a cepa G3P[9] RV10109 foi detectada (Maestri *et al.*, 2012). Esta amostra foi isolada em 2006 de uma criança com diarreia. A análise filogenética sugeriu uma possível origem felina/canina ou múltiplos eventos recombinantes (Maestri *et al.*, 2012) o que difere dos nossos resultados que sugerem uma origem humana para os genes VP4 e VP7 para as amostras G3P[9].

A frequência do G3P[9] no Rio de Janeiro, de 1997 a 1999, foi de 5,9% (Luchs *et al.*, 2012). Contudo, entre os anos de 1996-2006, a frequência do G3P[9] diminuiu para

2,46% e mostrou uma combinação variável nos genes VP6 e NSP4 tais com G3-P[9]-I1-E1 (50%), G3-P[9]-I2-E2 (25%) and G3-P[9]-I3-E3 (25%) conforme demonstrado por Benati *et al.*, (2010). Esses resultados diferem dos nossos já que foi observada uma frequência de 18,9% na comunidade Quilombola. Além disso, o G3P[9] tem sido descrito em diferentes combinações de genes o que pode ser observado para as amostras da comunidade Quilombola considerando os novos genótipos VP6 e NSP1 aqui reportados.

O presente estudo caracterizou um novo genótipo para os genes VP6 e NSP1 de uma cepa rara de RVA G3P[9]. Além disso, foi realizada a caracterização genômica para todos os segmentos gênicos do rotavírus ampliando o entendimento da grande diversidade genética dos rotavírus mantidos por vários eventos recombinantes. O surgimento de novas cepas de rotavírus durante o período pós-vacina pode representar um desafio para as estratégias de vacinação e destacar a importância da vigilância do episódio diarreico nesta comunidade semi-isolada e de afrodescendentes.

Com relação ao aleitamento materno 34 (19,20%) crianças na faixa etária de 0-3 anos idade receberam o aleitamento materno de forma exclusiva.

7.3.2 Aspectos epidemiológicos das infecções parasitárias

No que diz respeito aos indivíduos não diarreicos, mas sintomáticos, o estudo mostrou uma alta incidência de parasitas, especialmente protozoários, quando comparados com o grupo diarreico. Tal fato já era esperado e reflete as inadequadas condições sanitárias a que a população está exposta favorecendo o estado de portador. A alta frequência de parasitas foi visto em crianças com faixa etária de 1 a 10 anos de idade. Damazio *et al.* (2013) também estudaram parasitas em uma comunidade quilombola, mas não especificaram se as amostras de fezes foram recuperadas a partir de indivíduos diarreicos ou não diarreicos.

Com relação à presença de um ou mais parasitas, o grupo diarreico apresentou 66,66% de infestação poliparasitária e o não diarreico, 72,81%. Tal fato pode ser justificado pelo fato do grupo não diarreico encontrar-se como portador crônico, favorecendo a disseminação e a persistência das enteroparasitoses na comunidade.

Vale ressaltar que diante do elevado índice de infestação pelos parasitas, optou-se pelo tratamento de todas as crianças parasitadas, independente das manifestações clínicas. As crianças receberam como tratamento a administração de vermífugos do grupo dos imidazólicos (Albendazol, Metronidazol e Mebendazol), além de orientações sobre cuidados de higiene e temas de educação em saúde.

No presente estudo, a frequência de coinfeções (55,59%, $p=0,0019$) foi maior quando comparado com os dados de outro estudo que relacionou a ocorrência de biparasitismo em 15,8% nas amostras pesquisadas (Damazio *et al.*, 2013). Contrariamente, nas aldeias indígenas Maxakali, no estado de Minas Gerais, Brasil, comunidade que também é semi isolada, foi observada uma frequência de 46% de poliparasitismo (Assis *et al.* 2013).

O baixo nível socioeconômico da população estudada aumenta o risco de desenvolvimento de doenças infecciosas e parasitárias, e isso é confirmado pelas elevadas taxas de parasitos intestinais (77,94%), semelhante aos 89,5% relatado por Assis *et al.*, (2013) nas aldeias indígenas Maxakali, em Minas Gerais, Brasil.

O presente estudo mostrou que o percentual de desnutrição na comunidade foi significativo (18,4%). Entre as crianças desnutridas, 14,3% tinham risco nutricional, 71,4%, desnutrição aguda grave e 14,3%, desnutrição crônica. Isto pode ser devido a problemas de saúde, habitação e acesso a água potável, condição saneamento e educação, má alimentação e, conseqüentemente, os processos infecciosos. Nossos resultados mostram um elevado número de crianças com menos de cinco anos de idade com desnutrição apesar do pequeno número de amostras analisadas. Além disso, as taxas foram maiores do que as relatadas para as 2.723 crianças brasileiras Afrodescendentes menores de cinco anos que apresentaram déficit de altura / idade de 11,6% e peso / idade de 8,1% (Brasil, 2008).

Com relação à associação entre vírus e parasitas, observou-se uma maior frequência de casos virais associado à infestação poli parasitária em 53,33% e com quadro clínico moderado (73,33%). Os RVA foram detectados em 91,66% do grupo diarreico com 45,83% poli infestados com enteroparasitas e apresentando quadro

clínico moderado em 83,33% dos pacientes. O RVC foi detectado em apenas uma amostra fecal do grupo diarreico e apresentando quadro clínico moderado e poli infestado com enteroparasitas.

A comunidade quilombola do Abacatal é semi-isolada, pois sua localização é de difícil acesso com os municípios vizinhos, Ananindeua e Marituba. A comunidade possui apenas uma escola primária e não apresenta infraestrutura de rede de esgoto, água encanada e posto de saúde. Toda economia local vem da agricultura de subsistência e da venda de seus subprodutos nos municípios vizinhos. A comunidade cria poucos animais para sua subsistência como suínos, galinhas e cavalos e ainda tem animais domésticos como cachorro e gato.

Nossos resultados levantam a questão sobre as possíveis razões para explicar a diferença entre os dados epidemiológicos, quando comparadas às comunidades semi-isoladas, como Quilombola com as comunidades urbanas típicas.

O estudo destaca a necessidade de implementar ações de prevenção na comunidade, incluindo medidas de educação para a saúde, a vacinação contra o rotavírus, e até mesmo a implementação de programas para controlar infestações parasitárias, incluindo o exame para os vermes de animais domésticos considerados como potenciais reservatórios parasitas.

7.4 Aspecto nutricional

O percentual de crianças com desnutrição deve-se em parte às precárias condições de saúde, moradia e acesso a serviços de água, esgoto e educação. A desnutrição dessa faixa etária é resultado da má alimentação e conseqüentemente dos processos infecciosos. Os resultados obtidos na comunidade do Abacatal demonstram um percentual expressivo de crianças menores de cinco anos com desnutrição apesar do número pequeno de amostras analisadas e igualam-se às crianças do Nordeste urbano de uma década atrás (Brasil, 2010b). Além disso, apresentam média superior à brasileira, onde a prevalência de desnutrição é estimada entre 1,7% e 4,6%.

8 CONCLUSÕES

1. Os enteroparasitas *Ascaris lubricoides*, *Trichuris trichiura*, *Entamoeba histolytica* e *Endolimax nana* foram predominantes em crianças e adultos da comunidade Quilombola do Abacatal;
2. O RVA, RVC e PBV foram detectados na comunidade quilombola do Abacatal no período de 2008 a 2010 sendo que os RVA foram associados tanto a casos esporádicos quanto a surto de gastroenterite;
3. A análise genotípica classificou os genótipos G2P[4] e G12P[6] na constelação DS-1-like, o genótipo G1P[8] na Wa-like e o genótipo G3P[9] na Au-1-like;
4. Foram detectados dois novos genótipos de rotavírus A para os genes VP6 (I18) e NSP1 (A19);
5. A avaliação nutricional das crianças de 0-10 anos demonstrou que a maioria delas apresentava-se eutrófica, mas uma parcela importante apresentou-se desnutrida;
6. O quadro clínico associado aos agentes virais variou de leve a moderado;
7. Este estudo é pioneiro sobre a prevalência de vírus entéricos e parasitas intestinais na comunidade Quilombola do Abacatal na região metropolitana de Belém, Pará, Brasil e reforça que as condições inadequadas de moradia e o limitado acesso aos serviços de água e esgoto aumentam o risco de gastroenterite na população.

9 BIBLIOGRAFIA

ANDRADE, E.C.; LEITE, I.C.G.; VIEIRA, M.T.; ABRAMO, C.; TIBIRIÇÁ, S.H.C.; SILVA, P.L. Prevalência de parasitoses intestinais em comunidade quilombola no município de Bias Fortes, Estado de Minas Gerais, Brasil, 2008. **Epidemiol Serv Saude**. V.20, p.337-44. 2011.

ARAGÃO, G.C.; MASCARENHAS, J.D.P.; KAIANO, J.H.L.; LUCENA, M.S.S.; SIQUEIRA, J.A.M.; FUMIAN, T.M.; HERNANDEZ, J.M.; OLIVEIRA, C.S.; OLIVEIRA, D.S.; ARAÚJO, E.C.; SOARES, L.S.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B. Norovirus diversity in diarrheic children from an African-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. **PloS One**. v.8, n.2, p.e56608, Fevereiro, 2013.

ARAUJO, E.C.; CLEMENS, S.A.; OLIVEIRA, C.S.; JUSTINO, M.C.; RUBIO, P.; GABBAY, Y.B.; DA SILVA, V.B.; MASCARENHAS, J.D.; NORONHA, V.L.; CLEMENS, R.; GUSMÃO, R.H.; SANCHEZ, N.; MONTEIRO, T.A.; LINHARES, A.C. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of two doses of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in healthy infants. **J Pediatr** (Rio J). v.83, n.3, p.217-24, Maio-Jun, 2007.

ASSIS, E.M.; OLIVIERIA, R.C.; MOREIRA, L.E.; PENA, J.L.; RODRIGUES, L.C. *et al.* Prevalence of intestinal parasites in the Maxakali indigenous community in Minas Gerais, Brazil, 2009. **Cad. Saúde Pública**. v.29, p.681-90, 2013.

BENATI, F.J.; MARANHÃO, A.G.; LIMA, R.S.; SILVA, R.C.; SANTOS, N. Multiple-gene characterization of rotavirus strains: evidence of genetic linkage among the VP7, VP4-, VP6-, AND NSP4-encoding genes. **J Med Virol**. v.82, n.10, p.1797-802, 2010.

BÁNYAI, K.; LÁSZLÓ, B.; DUQUE, J.; STEELE, A.D.; NELSON, E.A.; GENTSCH, J.R.; PARASHAR, U.D. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. **Vaccine**. v.27, n.30, Suppl 1, p. A122-30, 2012.

BALL, J.M.; TIAN, P.; ZENG, C.Q.Y.; MORRIS, A.P.; ESTES, M.K. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science**. v.272, n.5258, p.101-104, Abril, 1996.

BLACKHALL, J.; FUENTES, A.; MAGNUSSON, G. Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. **Virology**. v. 225, n.1, p.181-90, Nov 1,1996.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VANDILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDAA. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**; v.28, p.495-503, 1990.

BOTH, G. W.; SIEGMAN, L. J.; BELLAMY, A. R.; IKEGAMI, N.; SHATKIN, A. J.; FURUICHI, Y. Comparative sequence analysis of rotavirus genomic segment 6 the gene specifying viral subgroups 1 and 2. **J Virol.** v. 51, p.97-101, 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias : guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.** – 8. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010. 444 p. Il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde), 2010a.

BRASIL, Ministério da Saúde, CGPAN. **Incorporação das curvas de Crescimento da Organização Mundial da Saúde de 2006 e 2007 no SISVAN.** Disponível em: <http://nutricao.saude.gov.br/documentos/curvas-oms-2006-2007>. Acessado julho de 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológicas.** Brasília/DF. 7.ed.; c 5, p 33-47. 2009.

Brasil, Ministério do Desenvolvimento Social. Políticas Sociais e Chamada Nutricional Quilombola: Estudos Sobre Condições de Vida Nas Comunidades e Situação Nutricional Das Crianças. **CADERNOS DE ESTUDOS: Desenvolvimento Social Em Debate;** Brasília, DF: MDS; 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. **Doença diarreica por rotavírus: Vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano – VORH.** Informe técnico, p 1-36, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. **Rotavírus: vacina evita 850 óbitos de bebês por ano.** Disponível em <http://www.brasil.gov.br/noticias/ultimas_noticias/24263_saude_060306>. Acesso em: 10 abr. 2006.

CABRAL-MIRANDA, G.; DATTOLI, V.C.C.; DIAS-LIMA, A. Enteroparasitos e condições socioeconômicas e sanitárias de uma comunidade Quilombola do semi-árido Baiano. **Rev Patol Trop.** v.39, p.48-55, 2010.

CASCIO, A.; BOSCO, M.; VIZZI, E.; GIAMMANCO, A.; FERRARO, D.; ARISTA, S. Identification of picobirnavirus from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea. **Eur. J. Epidemiol.**, v.12, p.545–547, 1996.

CICCARELLI, S.; STOLFI, I.; CARAMIA, G.; Management strategies in the treatment of neonatal and pediatric gastroenteritis. **Infection and Drug Resistance**.,v.6, p. 133–161, 2013.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional.** Tradução de Barbosa. J.; Vasconcelos. M.; Voeux. P. 6.ed. Rio de Janeiro, 2000.

CUNLIFFE, N.A.; WOODS, P.A.; LEITE, J.P.G.; DAS, B.K.; RAMACHANDRAN, M.; BHAN, M.K.; HART, C.A.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Sequence analysis of NSP4 gene of human rotavirus allows classification into two main genetic groups. **J. Med. Virol.**, v. 53, n.(1), p. 41-50, Set 1997.

DAMAZIO, S.M.; LIMA, M.S.; SOARES, A.R. Intestinal parasites in a quilombola community of the Northern State of Espírito Santo, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v. 55, n.3, pii: S0036-46652013000300179, 2013.

DAS, B.K.; GENTSCH, J.R.; CICIRELLO, H.G.; WOODS, P.A.; RAMACHANDRAN, M.; GUPTA, A.; *et al.* Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **J. Clin. Microbiol.**, Jul. v.32, n.7, p.1820-1822, 1994.

DO CARMO, G.M.; YEN, C.; CORTES, J.; SIQUEIRA, A.A.; DE OLIVEIRA, W.K.; CORTEZ-ESCALANTE, J.J.; LOPMAN, B.; FLANNERY, B.; DE OLIVEIRA, L.H.; CARMO, E.H.; PATEL, M. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **PLoS Med.**; v.8, n.4, p. e1001024. Abril, 2011.

DENNEHY, P.H. Rotavirus vaccines: an overview. **Clin Microbiol Rev.**; v.21, n.1, p.198-208, Jan, 2008.

DENNEHY, P.H. Treatment and prevention of rotavirus infection in children. **Curr Infect Dis Rep**. v.15, n.3, p. 242-50, Jun. 2013.

DESSELBERGER, U.; MANKTELOW, E.; LI, W.; CHEUNG W.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; GRAY, J. Rotaviruses and rotavirus vaccines. **Br Med Bull.**; v.90, p.37-51, 2009.

DESSELBERGER, U. Global issues related to enteric viral infections. **Virusdisease.**; v.25, n.2, p.147-9, 2014.

ESTES, M.K.; GREENBERG, H.B. In: **Fields Virology**, 6 ed. Editado por KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; p.1347-1401, 2013.

ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: **Fields Virology**, 6 ed. Editado por KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.,. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; p.1347-1401, 2007.

ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: **Fields Virology**, 4ed. Editado por KNIPE, D. M. *et.al.*, Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; p.1426-1454, 2001.

FAUS, E.C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D.R. Comparative Efficiency of Various Technics for the Diagnosis of Protozoa and Helminths in Feces. **J. Parasitol.**; v.25, p.241, 1939.

FREGOLENTE, M.C.; GATTI, M.S. Nomenclature proposal for picobirnavirus. **Arch Virol.**; v.154, n.12, p.1953-4, 2009.

FREITAS, R.B.; GABBAY, Y.B.; PEREIRA, J.D.M.; LINHARES, A.C.; LINS, Z.C.; NETO, S.F. Surto familiar de gastroenterite aguda associados a rotavírus em Belém, Pará. **Rev. Lat-amer. Microbiol.**; v.29, p.225-229, 1987.

FUMIAN, T.M.; ARAGÃO, G.C.; MASCARENHAS, J.D.; KAIANO, J.H.; SIQUEIRA, J.A.; SOARES, L.S.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B. Detection of a novel recombinant strain of norovirus in an African-descendant community from the Amazon region of Brazil in 2008. **Arch Virol.**; v.157, n.12, p.2389-92, Dez, 2012.

GABBAY, Y.B.; JIANG, B.; OLIVEIRA, C.S.; MASCARENHAS, J.D.P.; LEITE, J.P.G.; GLASS, R.I.; LINHARES, A.C. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care centre in Belém, Brazil. **J Diarrhoeal Dis Res.**; v.17, p.69-74, 1999.

GABBAY, Y.B.; BORGES, A.A.; OLIVEIRA, D.S.; LINHARES, A.C.; MASCARENHAS, J.D.P.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O.; WANG, Y.; GLASS, R.I.; JIANG, B. Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belém, Brazil. **J Med Virol.**; v.80, p.1666-74, 2008.

GANESH, B.; NAGASHIMA, S.; GHOSH, S.; Nataraju, S.M.; Rajendran, K.; Manna, B.; Ramamurthy, T.; Niyogi, S.K.; Kanungo, S. et al. . Detection and molecular characterization of multiple strains of Picobirnavirus causing mixed infection in a diarrhoeic child: Emergence of prototype Genogroup II-like strain in Kolkata, India. **Int J Mol Epidemiol Genet.**; v.2, p.61-72, 2011.

GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; GOUVEA, V. GORZIGLIA, M.; FLORES, J.; DAS, B.K.; BHAN, M.K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**; v.30, n.6, p.1365-1373, 1992.

GIORDANO, M.O.; MASACHESSI, G.; MARTINEZ, L.C.; BARRIL, P.A.; FERREYRA, L.J.; ISA, M.B.; NATES, S.V. Two instances of large genome profile picobirnavirus occurrence in Argentinian infants with diarrhea over a 26-year period (1977-2002). **J Infect.**; v.56, n.5, p.371-5, Maio; 2008.

GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOOD, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, F.H.; FORRESTER, B.; FANG, Z.Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J Clin Microbiol.**; v.28, n.2, p. 276-82, 1990.

GOUVEA, V.; ALLEN, J.R.; GLASS, R.I.; FANG, Z.Y.; BREMONT, M.; COHEN, J.; MCCRAE, M.A.; SAIF, L.J.; SINARACHATANANT, P.; CAUL, E.O. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol.**; v.29, p.519-23, 1991.

GRAY, J.; VESIKARI, T.; VANDAMME, P.; GIAQUINTO, C.; MRUKOWICZ, J.; GUARINO, A.; DAGAN, R.; SZAJEWSKA, H.; USONIS, V. Rotavirus. **JPGN**; v.14, p.S24-S31, 2008.

GREENBERG, H.; MCAULIFFE, V.; VALDESUSO, J.; WYATT, R.; FLORES, J.; KALICA, A.; HOSHINO, Y.; SINGH, N. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. **Infect Immun.**; v.39, n.1, p.:91-9, Jan 1983.

HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. Sedimentation concentration method in Shistosomiasis mansoni. P. R. **J Publ Hlth.**; v.9, p. 283–291, 1934.

HUANG, H.; *et.al.* Interaction(s) of rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) C-terminal peptides with model membranes. **Biochem. J.**; v.380, n.15, p. 723-733, Jun, 2004.

ITERPA, Territórios Quilombolas. Texto, Instituto de Terras do Pará; Organização, Jane Aparecida Marques e Maria Ataíde Malcher. **ITERPA**, v.74, p. il, Belém, 2009.

ITURRIZA GÓMARA, M.; WONG, C.; BLOME, S.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J Virol.**; v.76, n.13, p.6596-601, Jul, 2002.

JAGANNATH, M.; *et.al.* N- and C- Terminal Cooperation in Rotavírus Enterotoxin: Novel Mechanism of modulation of the Properties of a Multifunctional Protein by a Structurally and Functionally Overlapping Conformational Domain. **J. Virol.**; v.80, n. 1, p.412-425, Jan, 2006.

JAYARAM, H.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. **Virus. Res.**; v.101, n.1, p.67-81, 2004.

KAPIKIAN, A.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. Rotaviruses. In: **Fields Virology** Editado por KNIPE, D. M.; *et.al.*, Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; p. 1787-1833, 2001.

KUZUYA, M; FUJII, R; HAMANO, M; NAKAMURA, J; YAMADA, M; NII, S; MORI, T. Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes. **J Clin Microbiol.**; v.34, n.12, p.3185-9, Dez, 1996.

LANATA, C. F.; FISCHER-WALKER, C. L.; OLASCOAGA, A. C.; TORRES, C. X.; ARYEE, M. J. & BLACK, R. E. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children, 5 Years of Age: A Systematic Review. **PLOS one**, v.8, n.9, 2013.

LANZIERI, T.M.; LINHARES, A.C.; COSTA, I.; KOLHE, D.A.; CUNHA, M.H.; ORTEGA-BARRIA, E.; COLINDRES, R.E. Impacto of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil. **Int J. Infec. Dis.**; v.15, p. e206-210, 2011.

LEE, R.M.; LESSLER, J.; LEE, R.A.; RUDOLPH, K.E.; REICH, N.G.; PERL, T.M.; CUMMINGS, D.A.T. Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. **BMC Infect. Dis.**; v.13, p.446, 2013. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/446>.

LEVY, K.; HUBBARD, A.E.; EISENBERG, J.N. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. **Int J Epidemiol.**; v.38, n.6. p.1487-96, Review, Dez, 2009.

LI, Z.; BAKER, M.L.; JIANG, W.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V. Rotavirus architecture at subnanometer resolution. **J Virol.**; v.83, n.4, p.1754-66, Fev, 2009.

LINHARES, A.C.; OLIVEIRA, C.S.; JUSTINO, M.C.A.; GABBAY, Y.B.; MASCARENHAS, J.D.P. Gastroenterite por rotavírus. *In: Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia*. Editado por Leão, R.N.Q. Samauma editorial, v.1, p.591-618, 2013.

LINHARES, A.C.; JUSTINO, M.C. Rotavirus vaccination in Brasil: effectiveness and health impact seven years post-introduction. **Expert Rev Vaccines.**; v.13, n.1, p.43-57, 2014.

LINHARES, A.C.; MASCARENHAS, J.D.P.; GUSMÃO, R.H.P.; GABBAY, Y.B.; FIALHO, A.M.; LEITE, J.P.G. Neonatal Rotavírus Infection in Belém, Northern Brazil: Nosocomial transmission of a P[6]G2 Strain. **J. Med. Virol.**; v.67, p. 418-426, 2002.

LINHARES, A.C. Rotavirus infection in Brazil: epidemiology and challenges for its control. **Cad. S. Pub.**; v.16, n.3, p.629-46, 2000.

LOPMAN, B.A.; REACHER, M.H.; VIPOND, I.B.; SARANGI, J.; BROWN, D.W. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. **Clin. Infect. Dis.**; v.39, n.3, p.318-324, 2004.

LUCHS, A.; MORILLO, S.G.; DE OLIVEIRA, C.M.; TIMENETSKY, M.C. Monitoring of group C rotavirus in children with acute gastroenteritis in Brazil: an emergent epidemiological issue after rotavirus vaccine? **J Med Virol.**; v.83, p.1631-6, 2011.

LYNCH, M.; SHIEH, W.J.; BRESEE, J.S.; TATTI, K.M.; GENTSCH, J.R.; JONES, T.; JIANG, B.; HUMMELMAN, E.; ZIMMERMAN, C.M.; ZAKI, S.R.; GLASS, R.I. Intussusception after administration of the rhesus tetravalent rotavirus vaccine (Rotashield): the search for a pathogenic mechanism. **Pediatrics.**; v.117, n.5, p.e827-32, Mai; 2006.

MAESTRI, R.P.; KAIANO, J.H.L.; NERI, D.L.; SOARES, L.S.; GUERRA, S.F.S.; OLIVEIRA, D.S.; FARIAS, Y.N.; GABBAY, Y.B.; LEITE, J.P.G.; LINHARES, A.C.; MASCARENHAS, J.D.P. Phylogenetic analysis of probable non-human genes of group A rotavirus isolated from children with acute gastroenteritis in Belém, Brazil. **J Med Virol.**; v.84, n.12, p.1993-2002, 2012.

MALIK, Y.S.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; DHAMA, K.; SHABBIR, M.Z.; GANESH, B.; KOBAYASHI, N.; BANYAI, K. Epidemiology, phylogeny, and evolution of emerging enteric Picobirnaviruses of animal origin and their relationship to human strains. **Biomed Res Int.** ; v.2014, p.780752, 2014.

MARIN, R.E.A.; CASTRO, E.M.R. **No caminho de Pedras de Abacatal**: experiência social de grupos negros no Pará. 2ª ed. Belém: NAEA/UFGA. 2004.

MASCARENHAS, J.D.P.; LINHARES, A.C.; BAYAMA, A.P.G.; LIMA, J.C.; SOUSA, M.S.; ARAÚJO, I.T.; HEINEMANN, M.B.; GUSMÃO, R.H.P.; GABBAY, Y.B.; LEITE, J.P.G. Molecular Analysis of VP4, VP7, and NSP4 Genes of P[6]G2 Rotavirus Genotype Strains Recovered from Neonates Admitted to Hospital in Belém, Brazil. **J. Med. Virol.**; v.78, p. 281-289, 2006.

MATTION, N.M.; REILLY, P.A.; DIMICHELE, S.J.; CROWLEY, J.C.; WEEKS-LEVY, C. Attenuated poliovirus strain as a live vector: expression of regions of rotavirus outer capsid protein VP7 by using recombinant Sabin 3 viruses. **J Virol.**; v.68, n.6, p.3925-33, Jun, 1994.

MATTHIJNSSENS, J.; VAN RANST, M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. **Curr Opin Virol.**; Review. v.2, n.4, p.426-33, ago., 2012.

MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P.H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M.; JOHNE, R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Arch Virol.**; v.157, n.6, p.1177-82, Jun, 2012.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, S.M.; ATTOUI, H.; BANYAI, K.; BRISTER, J.R.; BUESA, J.; ESONA, M.D.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; JOHNE, R.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.; NAKAGOMI, O.; PARREÑO, V.; RAHMAN, M.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; PATTON, J.T.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Arch Virol.**; v.156, n.8, p.1397-413, Ago., 2011.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BANYAI, K.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J.T.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Arch Virol.**; v.53, p.1621-1629, 2008b.

MATTHIJNSSENS, J.; RAHMAN, M.; MARTELLA, V.; XUELEI, Y.; DE VOS, S.; DE LEENER, K.; CIARLET, M.; BUONAVOGLIA, C.; VAN RANST, M. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. **J Virol.**; v.80, n.8, p.3801-10, Abr., 2006.

MERTENS, P. The dsRNA viruses. **Virus. Res.**; v101, n.1, p.3-13, 2004.

MIJATOVIC-RUSTEMPASIC, S.; BÁNYAI, K.; ESONA, M.D.; FOYTICH, K.; BOWEN, M.D.; GENTSCH, J.R. Genome sequence based molecular epidemiology of unusual US Rotavirus A G9 strains isolated from Omaha, USA between 1997 and 2000. **Infect Genet Evol.**; v.11, n.2, p.522-7, Mar., 2011.

MOLINARI, B.L.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Genetic variability of VP6, VP7, VP4, and NSP4 genes of porcine rotavirus group H detected in Brazil. **Virus Res.**; v.197, p.48-53, Feb. 2, 2015.

MORAES, A.C.; CASTRO, F.M.M. Diarréia aguda. **Jornal Brasileiro de Medicina**, n.3, v.100, p.41-50; 2012.

NAKAGOMI, O.; KAGA, E. Distinctness of NSP1 gene of human rotavirus AU-1 from NSP1 gene of other human genogroups. **Res Virol.** ; v.146, n.6, p.423-428, Nov-Dez., 1995.

NILSSON, M.; SVENUNGSSON, B.; HEDLUND, K.O.; UHNOO, I.; LAGERGREN, A.; AKRE, T.; SVENSSON, L. Incidence and genetic diversity of group C rotavirus among adults. **J Infect Dis.**; v.182, p.678-84, 2000.

OKOH, A.I.; SIBANDA, T.; GUSHA, S.S. Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. **Int J Environ Res Public Health**. Review. v.7, n.6, p.2620-37, Jun., 2010.

OLIVEIRA, A.S.J.; RODRIGUES, F.E.; CORRÊIA, L.S., *et al.* **Quilombolas do Pará: condições de vulnerabilidade nas comunidades de remanescentes de Quilombo**. Assis: Triunfal Gráfica e Editora, 114p.:il; 30cm, 2011.

O'RYAN, M.; LINHARES, A.C. Update on Rotarix: an oral human rotavirus vaccine. **Expert Rev Vaccines**. Review. v.8, n.12, p.1627-41, Dez., 2009.

PAPP, H.; AL-MUTAIRI, L.Z.; CHEHADEH, W.; FARKAS, S.L.; LENGYEL, G.; JAKAB, F.; MARTELLA, V.; SZÚCS, G.; BÁNYAI, K. Novel NSP4 genotype in a camel G10P[15] rotavirus strain. **Acta Microbiol Immunol Hung.**; v.59, n.3, p.411-21, Set., 2012.

PEREIRA, H.G.; LINHARES, A.C.; CANDEIAS, J.A.; GLASS, R.I. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. **Bull Pan Am Health Organ.**; v.27, n.3, p.224-33, 1993.

PEREIRA, H.G.; FLEWETT, T.H.; CANDEIAS, J.A.; BARTH, O.M. A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. **J Gen Virol.**; v.69, n.11, p.397-8, Nov., 1988

PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.; BARTH, O.M.; SUTMOLLER, F.; DE FARIAS, V.; VIDAL, M.N. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid

diagnosis of rotavirus infection in children. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v.78, n.4, p.483-490, Out./Dez.,1983.

PRINCE, D.S.; ASTRY, C.; VONDERFECHT, S.; JAKAB, G.; SHEN, F.M.; YOLKEN, R.H. Aerosol transmission of experimental rotavirus infection. **Pediatr Infect Dis.**; v.5, n.2, p.218-22, Mar-Abr.; 1986.

Quilombola Palmares. Disponível em: <http://www.palmares.gov.br/> Acesso em 12 março 2015.

ROSEN, B.I.; FANG, Z.Y.; GLASS, R.I.; MONROE, S.S. Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. **Virology**; v.277, p. 316–329, 2000.

RUIZ, M.C.; LEON, T.; DIAZ, Y.; MICHELANGELI, F. Molecular biology of rotavirus entry and replication. **Scientific World J.**; Review. v.16, n.9, p.1476-97, Dez., 2009.

SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Rev. Med. Virol.**; v.15, n.1, p.29-56, Jan.-Fev., 2005.

SANTOS, N.; SOARES, C.C.; VOLATÃO, E.M.; ALBUQUERQUE, M.C.M.; HOSHIRO, Y. Surveillance of Rotavirus Strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. **J Clin Microbiol.**; v.41, n.7, p.3399–402, 2003.

SETTEMBRE, E.C.; CHEN, J.Z.; DORMITZER, P.R.; GRIGORIEFF, N.; HARRISON, S.C. Atomic Model of an infectious rotavirus particle. **Embo j.**; v.30, n.2, p.408-416, 2011.

SHAW, R.D.; HEMPSON, S.J. Replication as a determinant of the intestinal response to rotavirus. **J Infect Dis.**; v.174, n.6, p.1328-31, Dez. 1996.

SILVA, M.F.; ROSE, T.L.; GÓMEZ, M.M.; CARVALHO-COSTA, F.A.; FIALHO, A.M.; ASSIS, R.M.; ANDRADE, JDA. S.; VOLOTÃO, EDE. M.; LEITE, J.P. G1P[8] species A rotavirus over 27 years--pre- and post-vaccination eras--in Brazil: full genomic constellation analysis and no evidence for selection pressure by Rotarix® vaccine. **Infect Genet Evol.**; v.30, p.206-18, Mar., 2015.

SILVA, K.T.F.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B. Microsurto familiares de gastroenterite aguda associada a rotovírus na área de Belém, Pará. **R. Fundação SESP.**; v.29, n.2, p.129-136, Rio de Janeiro, 1984.

SOARES, L. S. **Caracterização antigênica e molecular de amostras de rotavírus do tipo G1, obtidas de crianças participantes de estudos em gastroenterites virais, no período de 1982 a 2003, em Belém, Pará, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

SOARES, L.S.; GUERRA, S.F.S.; OLIVEIRA, A.S.L.; SANTOS, F.S.; MENEZES, E.M.F.C.; MASCARENHAS, J.D.; LINHARES, A.C. Diversity of rotavirus strains circulating in Northern Brazil after introduction of a rotavirus vaccine: high prevalence of G3P[6] genotype. **J Med Virol.**; v.86, n.6,p.1065-72, Jun., 2014.

SOUZA, E C.; et.al. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **J. de pediatria**, Porto Alegre, v. 78, n. 1, jan-fev., 2002.

Swiss Institute of Bioinformatics. **Picobirnaviridae. Molecular Biology**, 2008. Disponível em http://viralzone.expasy.org/all_by_species/602.html). Acesso em: nov/2012.

TARAPOREWALA, Z.F.; PATTON, J.T. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. **Virus Res.** Review; v.101,n.1, p.57-66, Abr., 2004.

TARAPOREWALA, Z.F.; PATTON, J.T. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. **J Virol.**; v.75, n.10, p.4519-27, Mai. 2001.

TARAPOREWALA, Z.; CHEN, D.; PATTON, J.T. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. **J Virol.**; v.73, n.12, p.9934-43, Dez. 1999.

TELMESANI, A. Oral rehydration salts, zinc supplement and rota virus vaccine in the management of childhood acute diarrhea. **J. of Family and Community Med.**; v.17, n.2, p. 79-82, Ago., 2010.

TROJNAR, E.; SACHSENRODER, J.; TWARDZIOK, S.; REETZ, J.; OTTO, P.H.; JOHNE, R. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. **J Gen Virol.**; v.94, n.1, p.136-42, Jan.,2013.

VARGHESE, V.; GHOSH, S.; DAS, S.; BHATTACHARYA, S.K.; KRISHNAN, T.; KARMAKAR, P.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T.N. Characterization of VP1, VP2 and VP3 gene segments of a human rotavirus closely related to porcine strains. **Virus Genes.**; v.32, n.3, p.241-7, Jun., 2006.

VICENTINI, F.; DENADAI, W.; GOMES, Y.M.; et al. Molecular characterization of noroviruses and HBGA from infected Quilombola children in Espírito Santo State, Brazil. **PloS One**; v.8, p.e69348, 2013.

WAKUDA, M.; PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K. Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. **J. Virol. Methods.**; v.126, n.1-2, p. 165-169, 2005.

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Virus causing gastroenteritis. **Clin. Microbiol. Infect.**; v.9, p.247-262, 2003.

WHO. **Diarrhoeal disease**. 2013 Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>.. Acesso em: mar/2013.

WHO **Rotavirus vaccines**. 2014. Disponível em http://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/rotavirus/en/. Acesso em: jan/2014.

YEAGER, M.; BERRIMAN, J.A.; BAKER, T.S.; BELLAMY, A.R. Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. **EMBO J.**; v.13, n.5, p.1011-8, 1 Mar. 1, 994.

ANEXO A – ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA



Carta de nº 009/2007
Protocolo CEP/IEC - Nº 0023/06
CAAE: 0024.0.072.000-06

Belém, 11 de janeiro de 2007.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto: “Avaliação clínica, epidemiológica e molecular das diarreias por agentes virais e parasitários entre crianças da comunidade quilombola do Abacatal, município de Ananindeua, Pará”.

Pesquisador Responsável: JOANA D'ARC PEREIRA MASCARENHAS

Conforme tramitação junto ao CEP/IEC, o projeto em questão foi considerado **aprovado**.

Recomenda-se ao coordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preenchidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Relatório Final - deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.


MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC

ANEXO B

Reagente de extração de genoma viral

a) Sílica

Dióxido de sílica	60 g
Água destilada q.s.p	500 mL

Homogeneizar a sílica e deixar sedimentar por 24 h. Aspirar por sucção 430 mL e desprezar o sobrenadante. Completar o volume para 500 mL com água destilada, homogeneizar, sedimentando-se naturalmente por 5 h. Aspirar, por sucção, 440 mL do sobrenadante e desprezá-lo. Ajustar o sedimento para pH 2,0 pela adição de 600 µL de ácido clorídrico 37%. Aliquotar 10 mL da solução em frascos de cor âmbar, autoclavar e estocar a TA.

b) Tampão L2

Isotiocianato de guanidina	120 g
Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4	100 mL

Homogeneizar o isotiocianato de guanidina juntamente com tris-HCl 0,1M, pH 6,4, até dissolver totalmente o soluto. Armazenar em frascos de cor âmbar e estocar a TA.

c) Tampão L6

Isotiocianato de guanidina	120 g
Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4	100 mL
Triton X-100	1,3 g
EDTA 0,2 M, pH 8,0	22 mL

Em um recipiente de vidro colocar EDTA 0,2 M, pH 8,0, juntamente com Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4. Adicionar o isotiocianato de guanidina e homogeneizar o até total dissolução. Por último, acrescentar Triton X-100 lentamente. Armazenar em frascos de cor âmbar e estocar a TA.

ANEXO C

Reagentes da coloração e revelação do genoma viral pela EGPA

FIXADOR

REAGENTES	CUBA PEQUENA	CUBA GRANDE
Etanol PA	10 mL	20mL
Ácido acético PA	0,5mL	1mL
Água destilada q.s.p.	100mL	200mL

CORANTE

REAGENTES	CUBA PEQUENA	CUBA GRANDE
Nitrato de prata	1mL	2mL
Água destilada q.s.p.	100mL	200mL

REVELADOR

REAGENTES	CUBA PEQUENA	CUBA GRANDE
Hidróxido de sódio 10M	7,5 mL	15mL
Formaldeído PA	0.8 mL	1.6mL
Água destilada q.s.p.	100mL	200mL

SOLUÇÃO PARA PARAR A REAÇÃO

REAGENTES	CUBA PEQUENA	CUBA GRANDE
Etanol PA	5mL	10mL
Água destilada q.s.p.	100mL	200mL

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Ministério da Saúde
Secretaria de Vigilância em Saúde
Instituto Evandro Chagas
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor (a)

Como deve ser de seu conhecimento, as diarreias compõem um grupo de doenças muito importantes dentre aquelas que acometem as diversas comunidades amazônicas. Estamos desenvolvendo um projeto de pesquisa intitulado Avaliação clínica, epidemiológica e molecular das diarreias por agentes virais e parasitários entre crianças da comunidade quilombola do Abacatal, município de Ananindeua, Pará, e que visa conhecer melhor os micróbios causadores das diarreias que ocorrem na comunidade.

Para iniciar este estudo necessitamos da sua permissão para coleta de amostra de fezes, na qual faremos os exames para diversos micróbios que causam diarreia. Também será realizado um exame médico seguido de preenchimento de uma ficha contendo seus dados pessoais e os sintomas que está apresentando. Após finalizar os exames, você será informado dos resultados encontrados em seu material. Todas as informações prestadas serão mantidas em segredo e a qualquer momento você poderá abandonar o estudo sem nenhuma perda ou penalidade relacionada ao seu atendimento de saúde. O material que sobrar dos exames realizados será guardado pelo Instituto Evandro Chagas e poderá ser objeto de outros estudos, no futuro.

Mesmo que o presente estudo não traga benefícios imediatos para a sua saúde, você estará contribuindo muito para que se conheça melhor esses micróbios que causam diarreia em sua comunidade. Se você estiver de acordo em participar do estudo assine abaixo.

Eu _____ representante legal
da _____ criança _____ Carteira de
identidade _____, declaro ter recebido esclarecimento sobre o projeto aqui
referido e concordo por vontade em participar do mesmo, doando fezes para estudos laboratoriais, além
de fornecer informações sobre minha pessoa ou criança sob a minha responsabilidade, que constarão
em uma ficha clínico-epidemiológica e que só poderão ser utilizadas em relatórios técnicos e publicações
científicas.

Ananindeua, _____ de _____ de 2006.

Assinatura ou impressão digital

Nota: Sua assinatura neste documento não isenta a equipe do projeto, sob hipótese alguma, das responsabilidades que assumiu ao desenvolver o estudo. De acordo com as recomendações que resultam da Conferência Internacional de Helsinque (1964) e Tóquio (1975), o presente termo de participação e consentimento apenas confirma sua aprovação, autorização e colaboração com respeito ao estudo que estamos propondo, em obediência à Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil. Para esclarecer alguma dúvida ou outras informações você pode procurar a Dr^a Joana Mascarenhas (32142016), Dr^a Consuelo Oliveira (32142012) ou Dr^a Luana Soares (32142025).

APÊNDICE B – FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

Ficha Clínico-epidemiológica Projeto Quilombola

Registro: _____

Data de atendimento: ____/____/____

Médico: _____

Identificação:

Nome: _____

Endereço: _____ Nº _____

Idade: _____ Sexo: () M () F

Data de Nascimento: ____/____/____ Naturalidade: _____

Pai: _____

Idade: _____ Escolaridade: _____

Mãe: _____

Idade: _____ Escolaridade: _____

Vacinação Contra Rotavírus:

1ª dose ____/____/____

2ª dose ____/____/____

Sinais e Sintomas Clínicos

Diarréia Sim () **Controle** Sim ()

Início: ____/____/____ Coleta das Fezes ____/____/____

Quantas vezes defecou ao dia: _____

Consistência das fezes: Líquidas () Pastosas ()
Sólidas () Muco ou sangue ()

Há quantos dias vem apresentando?

Volume das fezes: Pequeno () Médio () Grande ()

Possui urgência em evacuar? Sim () Não ()

A diarreia surgiu após ingestão de água ou alimento? Sim () Não ()

Em caso afirmativo, quanto tempo após a ingestão?

Outros Sintomas Associados

Náuseas (enjôos): Sim () Não ()

Falta de apetite: Sim () Não ()

Vômito: Sim () Não () Frequência de vômitos ao dia: _____

Febre referida: Sim () Não ()

Temperatura aferida (Grau): _____

Dor Abdominal: Sim () Não ()

Desidratação (Grau): _____

Condições Biológicas Individuais

Aleitamento materno exclusivo: Sim () Não () Quanto tempo: _____

Aleitamento ao seio complementar até idade de: _____

Fez uso de medicamento: Sim () Não () Qual: _____

Dados Complementares

Renda Familiar: _____

Água encanada: Sim () Não ()

Água tratada: Sim () Não ()

Banheiro: Fora da casa () Dentro da casa ()

Possui poço tubular ? Sim () Não ()

O poço fica perto do banheiro ? Sim () Não ()

O poço é coberto ? Sim () Não ()

Lava os alimentos antes de consumi-los ? Sim () Não ()

Possui coleta de lixo ? Sim () Não ()

A região em torno da casa é alagada ? Sim () Não ()

Possui animais na casa ? Sim () Não ()

Quantos ? _____ Quais ? _____
_____**Exame Físico**

Peso: _____

Altura: _____

Mucosas: _____

Pele: _____

Alterações encontradas: _____

_____**Impressão diagnóstica:** _____

_____**Exames Complementares Solicitados**

Rotavírus

Resultado: Positivo () Negativo ()

Eletróferotipo: Curto () Longo ()

Genótipo: G: P[] Combinação Binária:

Astrovírus

Resultado: Positivo () Negativo ()

Calicivírus

Resultado: Positivo () Negativo ()

Hepatite E

Resultado: Positivo () Negativo ()

Parasitológico das fezes:

Resultado: _____

_____**Outros Exames** _____

_____**Resultado** _____

_____**Medicação prescrita:** _____

APÊNDICE C – ARTIGO SUBMETIDO

Prevalence of intestinal enteropathogens in an African-descendant community in Northern Brazil.

Submetido à revista Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene.

Prevalence of intestinal enteropathogens in an African-descendant community in Northern Brazil

Joana D. P. Mascarenhas ^{a,*}, Jane H. L. Kaiano ^b, Luana S. Soares ^a, Consuelo S. Oliveira ^a, Glicélia C. Aragão ^c, Eliete C. Araújo ^d, Isabel R. C. Rodrigues ^a, Krynssya K. Oliveira ^e, Euzeni M. F. C. Menezes ^a, Yvone B. Gabbay ^a, Alexandre C. Linhares ^a

^aSeção de Virologia, Instituto Evandro Chagas (IEC), Ananindeua, BR 316, Km 07, s/n, Ananindeua, Pará, PA, 67.020-000, Brazil.

^bNúcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, PA, Brazil.

^cCentro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará (UEPA), Belém, PA, Brazil.

^dInstituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil.

^eFundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, Belém, PA, Brazil.

* Corresponding author: Joana D'Arc Pereira Mascarenhas, Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rodovia BR 316–KM 07, S/N, Levilândia, 67.030-000, Ananindeua, Pará, Brazil.

Tel: + 55 91 32142016; Fax + 55 91 32142006.

E-mail: joanamascarenhas@iec.pa.gov.br

ABSTRACT

Background: Gastroenteritis is a major cause of morbidity and mortality in children, especially in developing countries. Few data about diarrhoea associated with enteric pathogens in African-descendant communities in Brazil is available.

Methodology: A total of 375 stool samples were collected from children and adults from April 2008 to September 2010 in an African-descendant community (Quilombola) in Brazil. Immunochromatography was used to detect group A rotavirus and RT-PCR were performed for group C rotavirus and picobirnavirus. Methods of sedimentation, centrifugation and direct examination were performed for intestinal parasites.

Results: Rotavirus A, Picobirnavirus and Rotavirus C were detected in 6.4% (24/375), 0.3% (1/375) and 1.3% (5/375) of samples, respectively. Parasitological tests were performed on 349 stool specimens, showing that 86.2% patients had infestation with at least one intestinal parasite. The most frequent intestinal parasites were *Entamoeba histolytica*/E. *dispar* 28.4% (99/349), *Ascaris lumbricoides* (27.8%; 97/349) and *Trichuris trichiura* (25.8%; 90/349). Associations between viruses and parasites were observed in 8% (15/177) of individuals. Nutritional analysis showed that 18.4% children were malnourished.

Conclusions: This study highlights the occurrence of enteropathogens and malnutrition in Quilombola community, showing the need to implement preventive actions involving improvement of health services and universal access to adequate sanitation conditions.

Key words: diarrhea, enteropathogens, malnutrition.

INTRODUCTION

In the past few years, a decline in morbidity and mortality from all- cause diarrhoea in children less than five years has globally been observed ^{1,2}. Diarrhoeal diseases represent the second cause of death among children worldwide, accounting for 750000 deaths each year in this age group ². In Brazil, mortality due to diarrhoeal disease has shown a downwards trend over time, where a reduction of 57% in the number of deaths in children aged 1-4 years was registered from 2000 to 2010 ³. These reductions were found to be steeper after 2006, following rotavirus vaccine introduction in the childhood immunization program, emphasizing the potential impact of universal rotavirus vaccination ^{4,5}.

Gastroenteritis is a serious public health problem, especially in developing countries, being one of the major causes of morbidity and mortality in children. Protein-energy malnutrition may occur as an outcome of chronic diarrhoea, affecting physical and intellectual development of children. In general, the high prevalence of gastroenteritis is related to the social, economic and cultural conditions of a population^{6,7}.

Many enteropathogens have been associated with diarrhoea such as bacteria, parasites and viruses ⁸. In this context, rotavirus, *Cryptosporidium*, enterotoxigenic *Escherichia coli* producing heat-stable toxin, and *Shigella* are the most frequent pathogens associated with moderate to severe diarrhoea cases ⁹.

In Brazil, there are 2000 African-descendant communities certified by Palmares Cultural Foundation, of which 141 (7.0%) are situated in the South Region, 227 (11.3%) in the Northern Region, 290 (14.5%) in the Southeast Region, 1228 (61.4%) in the Northeast Region, and 114 (5.8%) in the Midwest Region ¹⁰. Most of these communities live in extreme poverty: 29% of them have access to garbage

collection service, 24% to sewage system, and 56% to running water¹¹. Furthermore, recent studies conducted in traditional communities have showed that the Food and Nutrition Insecurity constitutes an important tool for that population¹²⁻¹⁴.

The aim of this study was to determine the frequency of enteric viruses and intestinal parasites in stool specimens from children and adults living in an African-descendant community (Quilombola) in Ananindeua, state of Pará, northern Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Study area and patients

This study involved an African-descendant community named Abacatal, which covers an area of 308 hectares and is located 8 km from the outskirts of Ananindeua and Marituba municipalities, metropolitan area of Belém, state of Pará, Amazon Region, Brazil. The studied population was about 400 inhabitants, including 84 families with 120 children aged below 10 years, living under poor sanitation and crowded conditions¹³.

This study was approved by Ethical Review Committee of Instituto Evandro Chagas, protocol number 009/2007, and written informed consents were obtained from parents or legal guardians before any study procedures. The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional committees on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008.

The nutritional status was assessed using as a parameter a 24-hour dietary food recall. Anthropometric parameters were weight / age, height / age, weight / height, body mass index (BMI) / Age and point cut expressed in units of standard deviation or Z score recommended by WHO and adopted by the Ministry of Health¹¹. In this

community, when people became ill, they were referred by a resident community health agent to the health unit that provided assistance to this population.

Clinical Specimens

Surveillance for gastroenteritis included twice a week visits from a pediatrician in the community, in order to detect any diarrhoeal episode in children. If an outbreak of gastroenteritis was detected, stools were also collected from adults.

Fecal specimens were collected from children aged less than 10 years with clinical symptoms including: three or more liquid or watery evacuations with fever, vomiting and abdominal pain in 24-hour period. Infants without diarrhoea were included as controls.

The samples were transported to the laboratories of Instituto Evandro Chagas and processed for viral agents, and examined for intestinal parasites before being stored at -20° C until being used for viral analysis.

Laboratory procedures

Virus detection

The present study search enteric viruses (RVA, RVC and PBV) and intestinal parasites, however the samples were not tested for other putative GE viruses and bacterial due to techniques unavailable in the laboratory.

The immunochromatography was used to detect group A rotavirus (RVA) in stool samples, using the commercial kit Rota Strip (CORIS BioConcept), according to the protocol supplied by the manufacturer. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was carried out in Tris-glycine buffer to determine RV and picobirnavirus (PBV) RNA electrophoretic profile¹⁶.

Viral genomes were extracted using silica-method as described previously¹⁷. Molecular assays were performed for group C rotavirus (RVC) and picobirnavirus (PBV). Polymerase chain reaction (PCR) was carried out using the following primers for RVC: C1/C4 (VP6 gene) and G8S/G8A (VP7 gene)^{18,19}. For PBV detection primers PicoB25-PicoB43 (RdRp gene) were used to determine genogroup I²⁰.

Examination for intestinal parasites

An aliquot of the fecal specimen was transferred to the collection bottle containing a liquid preservative (Coprotest ®) and sent to the parasitology laboratory. Methods of sedimentation, centrifugal flotation in zinc sulfate solution, Baermann-Moraes and direct examination were performed according to standard techniques^{21,22}. Two slides were examined for each stool sample to detect parasites using optical microscopy (Nikon, Japan) with magnifications of 100x and 400x.

Data Analyses

The frequencies of enteric viruses and intestinal pathogens were determined using Microsoft Excel software. Comparisons of frequencies among the groups were performed using χ^2 test through BioEstat 5.0²³. Statistical significance was established at p-value <0.05.

RESULTS

From April 2008 to September 2010, a total of 375 stool samples were obtained from 177 patients. From these, 110 and 265 samples were collected from 75 diarrheic and 102 non-diarrheic subjects, respectively. Frequencies of viral agents were:

RVA 6.4% (24/375), RVC 0.3% (1/375), and PBV 1.3% (5/375). All samples from diarrheic and non-diarrheic patients were screened by PAGE and confirmed by RT-PCR for RVC and PBV.

Figure 1 shows the temporal distribution of viral agents associated with or without gastroenteritis cases in children and adults. RVA was observed during all three years of study, and RVC was detected in diarrheic patient only in 2008. In same period, RVA was detected in 3.6% (3/82) of cases, and in 2010 there was an outbreak caused by RVA involving children and adults during July-September, with an overall positivity rate of 12.5% (20/160). From these, 16 were from diarrheic patients and four from non-diarrheic subjects.

PBV had an overall frequency of 1.3% (5/375), being 2.7% (3/110) in diarrheic patients and 0.7% (2/265) in the asymptomatic group. The samples were subjected to PAGE, showing two genomic segments and confirmed by RT-PCR, as being Genogroup I as demonstrated by amplification of 240 bp products (data not shown).

Table 1 shows the frequencies of enteric viruses according to age distribution and clinical characteristics. RV and PBV were detected mostly in patients aged >10 years with diarrhoea.

Parasitological examinations were performed on 349 stool samples collected from 174 individuals with 150 (86.2%) showing infestation with at least one intestinal parasite, resulting in 271 (77.6%) positive specimens. Among helminths, the most frequent was *Ascaris lumbricoides* detected in 27.8% of cases (97/349), followed by *Trichuris trichiura* (25.8%, 90/349), hookworms (6.8%, 24/349), and *Strongyloides stercoralis* (1.4%, 5/349). With regards to protozoa, *Entamoeba histolytica*/ *E. dispar*, *Endolimax nana*, and *Giardia lamblia* were associated with 28.4% (99/349), 24.3%

(85/349) and 21.2% (74/349) of cases, respectively. Table 2 shows the parasite frequencies associated with age distribution and clinical characteristics.

With regards to association between viruses and parasites, it was occurred among 8% (15/177) of individuals, being 16% (12/75) in diarrheic group and 2.9% in asymptomatic group (3/102) ($p=0.01$) (data not shown).

Frequencies of vomiting, fever and abdominal pain were 41.5%, 46.3% and 58.5% in diarrheic children, respectively, while the non-diarrheic, but symptomatic children, showed 5%, 3.4% and 30.5% of these symptoms, with a value statistically significant (Table 3).

The present study included nutritional evaluation of 38 children aged 0-10 years, of both sexes, being 31/38 (81.6%), classified as eutrophic and 7/38 (18.4%) as malnourished. From these, 1/7 (14.3%) showed nutritional risk, 5/7 (71.4%) severe acute malnutrition, and 1/7 (14.3%) chronic malnutrition (data not shown).

DISCUSSION

There have been few reports on the epidemiology of gastroenteritis in African-descendant communities in Brazil. This study is the first report on the prevalence of enteric viruses and intestinal parasites in an African-Brazilian, semi-closed community in Pará, Brazil. The overall prevalence rates of RVA, RVC, and PBV were of 6.4%, 0.3%, and 1.3%, respectively. Data on the occurrence of other viruses in the same community were shown, where the frequency of norovirus, sapovirus and astrovirus were described in 19.7%, 2.5% and 1.2% of the cases respectively, being detected in diarrheic individuals only²⁴.

The RVA was found throughout the three years of study. In 2010 an outbreak was observed among children and adults with increasing frequencies from

3.6% to 12.5%. RVA was detected in 16 diarrheic children and among four non diarrheic children. RVC was detected by PAGE and confirmed by RT-PCR in a diarrheic child aged five years. Unlike our findings, in a study conducted in the Quilombola Community of São Mateus and Conceição da Barra located at Southeast region of Brazil, RVA or RVC were not found ²⁵. Our results demonstrated the circulation of RVA associated with either sporadic cases or outbreak of diarrhea. Although RVC was detected at low rates and no outbreak of diarrhoea has reported, our results are in agreement with the low prevalence of RVC registered in several settings, including Belém, Pará, Brazil ^{18,26-30}.

Rotavirus infection is characterized by the abrupt onset of vomiting, and thereafter high fever and profuse diarrhoea (watery and yellowish, with mucus in 25% of cases), and, depending on the intensity of these symptoms, isotonic dehydration too. In the present study it was reported one case of RV GE in a child of 4 years, requiring hospitalization for intravenous rehydration. Only this case was confirmed as rotavirus-positive, despite vaccination against rotavirus had not been administered to infants. This finding may be explained by protection conferred by prolonged breastfeeding in this population ³¹.

In this study, PVB was detected at an overall rate of 1.3%, being 2.7% in a diarrheic case and associated with helminths; and 0.7% among asymptomatic individuals, associated with protozoa. This is the first detection of PBV in a semi closed community; however, these results are in agreement with those reported in Italy, Brazil, India and Argentina ³²⁻³⁵. Although PBV has been associated with mild to severe diarrhoea in immunocompromised individuals, symptoms tend to be more severe, and it has been considered opportunistic pathogens if associated with other viral gastroenteritis agents. In humans, this pathogenicity is still questionable, since these

agents have been detected in symptomatic and asymptomatic individuals. In this study PBV was found in both symptomatic and asymptomatic individuals, and associated with helminths associated with mild diarrhoea. Association with protozoa was also found.

It is worth emphasizing that although we have not recorded any gastroenteritis outbreaks caused by norovirus in the Quilombola community, they were detected only in diarrheic children at a frequency of 19.7%, as previously described ²⁴. This positivity rate was higher if compared to that study conducted in Southeast region of Brazil, where norovirus were reported in 9.2% of diarrheic patients, and 1.5% in non-diarrheic individuals ²⁵.

Among the parasites found in this study, it was observed that the most common helminths were *Ascaris lumbricoides* (27.8%) and *Trichuris trichiura* (25.8%), whereas, among the protozoa, *Entamoeba histolytica/ E. dispar* (28.4%) and *Endolimax nana* (24.3%) were predominant. In contrast, hookworms were the most frequent helminths (14.6%) in a study conducted in a Quilombola community located in Espírito Santo city, Brazil ³⁶. *Entamoeba histolytica/ E. dispar* and *Endolimax nana* were detected in a lower frequency of 8.5% and 4.9%, respectively. This diversity was also found in others studies on intestinal parasites occurrence in Quilombola community in the states of Bahia and Minas Gerais, Brazil, respectively ^{37,38}. Of note, children and adults found to have parasites in their stools, in the Quilombola community of the present study, were properly treated.

With respect to the non-diarrheic but symptomatic individuals, the study showed a high incidence of parasites when compared to the diarrheic group, especially protozoa. This fact may be due to poor sanitation conditions in this community, favoring the carrier state as observed by Damazio et al. (2013) ³⁶ also studying parasites in the Quilombola community.

Coinfections involving RVA, RVC, PBV and intestinal parasites in the community was registered in 8% of individuals, mostly in diarrheic group (16%), possibly explained by the poor sanitation conditions in our study setting. In the present study the overall frequency of coinfections was lower when compared with data of another study that related the occurrence of biparasitism in 15.8% of samples founded³⁶. In contrast, in the Maxakali indigenous villages in the state of Minas Gerais, Brazil a higher rate of polyparasitism was observed (46%)³⁹.

The low socio economic profile of studied population enhances the risk of developing infectious and parasitic diseases, and this is confirmed by the high rates of intestinal parasites (86.2%). This high incidence of intestinal parasites is similar to that study in the Maxakali indigenous, where the occurrence of intestinal parasites was 89.5%³⁹.

The present study showed that the percentage of malnutrition in this community was significant (18.4%). Among malnourished children, 14.3% had nutritional risk, 71.4% severe acute malnutrition, and 14.3% had developed chronic malnutrition. This may be due to poor health, housing, and access to water, sanitation condition and education, poor diet and consequently infectious processes. Our results show a high number of children less than five years old with malnutrition, although the small number of samples analyzed. In addition, rates were greater than those reported for the 2,723 Brazilian African-descendant children under five years as assessed by the height deficit / age (11.6%) and weight / age (8.1%)¹¹.

Our results raise the question about possible reasons to explain the difference between epidemiological data, when comparing semi closed communities, such as Quilombola, and typical urban communities.

In conclusion, this study highlights the need to implement preventive actions in the community, including health education measures, rotavirus vaccination, and even the implementation of programs to control parasitic infestations, including examination for worms of domestic animals considered as potential reservoirs parasites.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

JDPM and LSS conceived and designed the study; JHLK, GCA, IRCR and EMFC were responsible for data collection and carried out laboratory methods; CSO and ECA were responsible for the clinical assessment; KKO contribution to nutrition analysis; YBG and ACL analyzed the data; JDPM, LSS and JHLK wrote the manuscript; YBG and ACL critically revised the manuscript for intellectual content All authors contributed to the preparation and revision of the manuscript and read and approved the final version. JDPM and LSS are guarantors of the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the infants, their families who enroll in this study, health workers and community leaders of the Abacatal “Quilombola” Community, and laboratory team of the Virology and Parasitology Section, Evandro Chagas Institute.

FINANCIAL SUPPORT

This research was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde and also received a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The funders had no role in study

design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

COMPETING INTERESTS

None

ETHICAL APPROVAL

This study was approved by Ethical Review Committee of Instituto Evandro Chagas, protocol number 009/2007, and written informed consents were obtained from parents or legal guardians before any study procedures. The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional committees on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008.

REFERENCES

1. Walker CLF, Aryee MJ, Boschi-Pinto C, et al. Estimating diarrhea mortality among young children in low and middle income countries. *PloS One*, 2012 7:e29151.
2. Liu L, Johnson HL, Cousens S, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 2012; 379:2151-61.
3. Mendes PSA, Ribeiro HC, Mendes CMC. Temporal trends of overall mortality and hospital morbidity due to diarrheal disease in Brazilian children younger than 5 years from 2000 to 2010. *J Pediatr (Rio J)* 2013; 89:315-25.
4. Gurgel RQ, Ilozue C, Correia JB, et al. Impact of rotavirus vaccination on diarrhoea mortality and hospital admissions in Brazil. *Trop Med In. Health TM IH* 2011; 16:1180-4.
5. Lanzieri TM, Linhares AC, Costa I, et al. Impact of rotavirus vaccination on childhood deaths from diarrhea in Brazil. *Int J Infec Dis* 2011; 15:e206-10.
6. Patel P, Chaudhary U, Chudasama RK. Intestinal parasites prevalence and related factors in hospitalized children age upto 12 years with diarrhea in Surat, India. *J Pediatr Sci* 2013; 5e:183.

7. Richard SA, Black RE, Gilman RH, et al. Diarrhea in early childhood: short-term association with weight and long-term association with length. *Am J Epidemiol* 2013; 178:1129-38.
8. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One* 2013; 8:e72788.
9. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 2013; 382:209-22.
10. Quilombola | Palmares. Available at: http://www.palmares.gov.br/?page_id=88. [accessed 30 october 2014].
11. Brasil, Ministério do Desenvolvimento Social. Políticas Sociais e Chamada Nutricional Quilombola: Estudos Sobre Condições de Vida Nas Comunidades E Situação Nutricional Das crianças. CADERNOS DE ESTUDOS: Desenvolvimento Social Em Debate:. Brasília, DF: MDS; 2008.
12. Silva JAN. Sanitary and health conditions at Caiana dos Crioulos, a quilombo community in the State of Paraíba. *Saúde e Soc* 2007; 16:111-24.
13. Oliveira ASJ, Rodrigues FE, Corrêa LS, et al. Quilombolas Do Pará: Condições de Vulnerabilidade Nas Comunidades de Remanescentes de Quilombo. Assis: Triunfal Gráfica e Editora 2011.
14. Silva DO, Guerrero AFH, Guerrero CH, et al. The causality of nutrition and food insecurity of quilombola communities with the construction of the BR-163, highway, Pará, Brazil. *Rev Nutr* 2008; 21:83s-7s.
15. Sousa LM, Martins KA, Cordeiro MM et al. School nutrition in “quilombola” communities: challenges and opportunities. *Ciênc. Amp Saúde Coletiva* 2013; 18:987-92.
16. Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, et al. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1983; 78:483-90.
17. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol* 1990; 28:495-503.
18. Gouvea V, Allen JR, Glass RI, et al. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29:519-23.
19. Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, et al. Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes. *J Clin Microbiol* 1996; 34:3185-89.

-
20. Rosen BI, Fang ZY, Glass RI, et al. Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. *Virology* 2000; 277:316-29.
 21. Faust EC, Sawitz W, Tobie J, et al. Comparative Efficiency of Various Technics for the Diagnosis of Protozoa and Helminths in Feces. *J Parasitol* 1939; 25:241.
 22. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. Sedimentation concentration method in Shistosomiasis mansoni. *P R J Publ Hlth* 1934; 9:283-91.
 23. Ayres M, Ayres-Jr M, Ayres D, et al. *BIOESTAT –Aplicações Estatísticas Nas Áreas Das Ciências Biomédicas*. 5th ed. Belém, Pará; 2007.
 24. Aragão GC, Mascarenhas JDP, Kaiano JHL, et al. Norovirus diversity in diarrheic children from an African-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. *PloS One* 2013; 8:e56608.
 25. Vicentini F, Denadai W, Gomes YM, et al. Molecular characterization of noroviruses and HBGA from infected Quilombola children in Espírito Santo State, Brazil. *PloS One* 2013; 8:e69348.
 26. Gabbay YB, Jiang B, Oliveira CS, et al. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care centre in Belém, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* 1999; 17:69-74.
 27. Gabbay YB, Borges AA, Oliveira DS, et al. Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belém, Brazil. *J Med Virol* 2008; 80:1666-74.
 28. Luchs A, Morillo SG, de Oliveira CM, et al. Monitoring of group C rotavirus in children with acute gastroenteritis in Brazil: an emergent epidemiological issue after rotavirus vaccine? *J Med Virol* 2011; 83:1631-6.
 29. Nilsson M, Svenungsson B, Hedlund KO, et al. Incidence and genetic diversity of group C rotavirus among adults. *J Infect Dis* 2000; 182:678-84.
 30. Pereira HG, Leite JP, Azeredo RS, et al. An atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1983; 78:245-50.
 31. Linhares AC, Carmo KB, Oliveira KK, et al. Nutritional status in relation to the efficacy of the rhesus-human reassortant, tetravalent rotavirus vaccine (RRV-TV) in infants from Belém, Pará state, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2002; 44:13-6.
 32. Cascio A, Bosco M, Vizzi E, et al. Identification of picobirnavirus from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea. *Eur J Epidemiol* 1996; 12:545-7.
 33. Fregolente MCD, de Castro-Dias E, Martins SS. Molecular characterization of picobirnaviruses from new hosts. *Virus Res* 2009; 143:134-6.

34. Ganesh B, Nagashima S, Ghosh S, et al. Detection and molecular characterization of multiple strains of Picobirnavirus causing mixed infection in a diarrhoeic child: Emergence of prototype Genogroup II-like strain in Kolkata, India. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2011; 2:61-72.
35. Giordano MO, Martinez LC, Masachessi G, et al. Evidence of closely related picobirnavirus strains circulating in humans and pigs in Argentina. *J Infect* 2011; 62:45-51.
36. Damazio SM, Lima MS, Soares AR. Intestinal parasites in a quilombola community of the Northern State of Espírito Santo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2013; 55(3) pii: S0036-46652013000300179.
37. Cabral-Miranda G, Dattoli VCC, Dias-Lima A. Enteroparasitos e condições socioeconômicas e sanitárias de uma comunidade Quilombola do semi-árido Baiano. *Rev Patol Trop* 2010; 39:48-55.
38. Andrade EC, Leite ICG, Vieira MT, et al. Prevalence of parasitic intestinal diseases in a quilombola community, in the Municipality of Bias Fortes, State of Minas Gerais, Brazil, 2008. *Epidemiol Serviços Saúde* 2011; 20:337-44.
39. Assis EM, Oliviera RC, Moreira LE, et al. Prevalence of intestinal parasites in the Maxakali indigenous community in Minas Gerais, Brazil, 2009. *Cad. Saúde Pública* 2013; 29:681-90.

Table 1. Detection of rotavirus and picobirnavirus in fecal samples from diarrheic and non-diarrheic members of an African-Brazilian semi closed community, Pará, Brazil. April 2008 to September 2010.

	RV		PBV	
	Positive	%	Positive	%
Age/years				
0-1 (n=35)	1	2.9	0	0
>1-5 (n=162)	7	4.3	1	0.6
>5-10 (n=97)	7	7.2	2	2.1
>10 (n=81)	9	11.1	2	2.5
Group				
Diarrheic (n=110)	20	18.2	3	2.7
Non-diarrheic (n=265)	4	1.5	2	0.7

Table 3 - Clinical symptoms among children from an African-Brazilian semi closed community.

Symptoms	Non-diarrheic, but				p-value
	Diarrheic group		symptomatic		
	(n=41)	%	(n=59)	%	
Vomit	17	41.5	3	5.0	0.0001
Anorexia	25	61.0	21	35.6	0.0214
Fever	19	46.3	2	3.4	0.0001
Abdominal pain	24	58.5	18	30.5	0.0097
Nauseas	7	17.1	6	10.2	0.4793

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

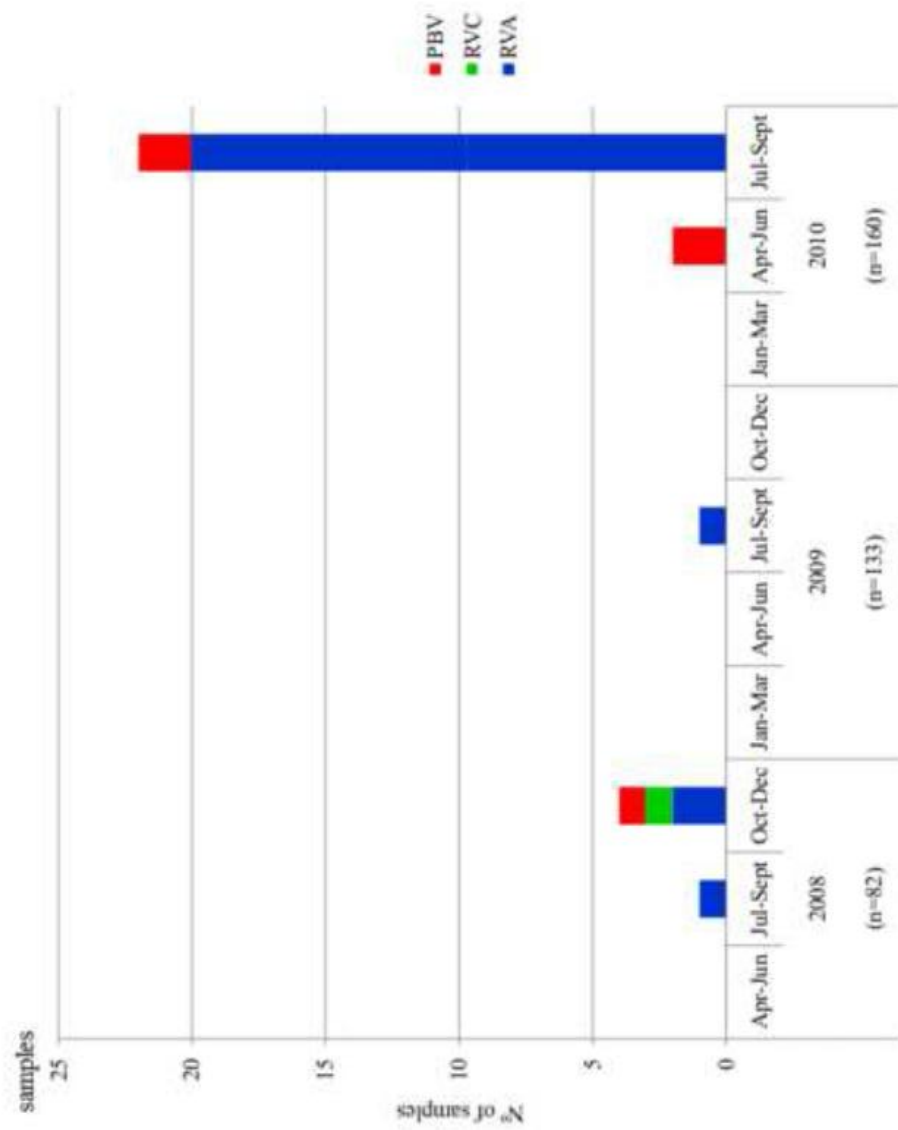


Figure Legends

Figure 1. Viral agents distribution among patients from an African-Brazilian semi closed community, between 2008 and 2010.

APÊNDICE D – ARTIGO SUBMETIDO

Detection of novel VP6 and NSP1 in rare G3P[9] rotavirus strain in an African-descendant community, Brazil.

Submetido à revista Journal of Clinical Virology

*Title Page (including author details, affiliations and word count)

**Detection of novel VP6 and NSP1 in rare G3P[9] rotavirus strain in an
African-descendant community, Brazil**

Jane Haruko Lima Kaiano

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará

Darleise de Souza Oliveira

Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Alexandre Costa Linhares

Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Joana D'Arc Pereira Mascarenhas*

Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

*Corresponding author

Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde

Rodovia Br 316, Km 7, s/n°, Levilândia

CEP: 67030-000 Ananindeua, Pará, Brasil

FAX: +00 55 91 32142006

E-mail: joanamascarenhas@iec.pa.gov.br

Count Word: 1187 words

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

1 **Detection of novel VP6 and NSP1 in rare G3P[9] rotavirus strain in an**

2 **African-descendant community, Brazil**

3

4 **Jane Haruko Lima Kaiano**

5 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará

6 **Darleise de Souza Oliveira**

7 Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

8 **Alexandre Costa Linhares**

9 Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

10 **Joana D’Arc Pereira Mascarenhas***

11 Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

12

13 *Corresponding author

14 Joana D’Arc Pereira Mascarenhas

15 Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde

16 Rodovia Br 316, Km 7, s/nº, Levilândia

17 CEP: 67030-000 Ananindeua, Pará, Brasil

18 FAX: +00 55 91 32142006

19 E-mail: joanamascarenhas@iec.pa.gov.br

20

21 Count Word: 1187 words

22

23 ABSTRACT

24 *Background:* A novel VP6 (I18) and NSP1 (A19) rotavirus genotype from an
25 unusual G3P[9] strain was characterized and obtained during an outbreak of
26 gastroenteritis in an African-descendant (“Quilombola”) community in Belém
27 Northern, Brazil.

28 *Objective:* To characterize the VP6 and NSP1 genes of a novel rotavirus genotypes
29 of a rare G3P[9] in a African-descendant community.

30 *Study design:* This study was a surveillance in a rural community during the period
31 2008-2010. At July 2010 an outbreak of diarrhea occurred and the rare RVA
32 G3P[9] genotype was detected. The samples were screened first by
33 immunochromatographic test and the extraction of viral RNA was applied to
34 positive samples followed by PAGE, RT-PCR, cloning and sequencing of the VP4,
35 VP7, VP6 and NSP1 genes.

36 *Results:* Seven (18.9%) RVA of 37 samples were characterized as G3P[9]
37 genotype. The VP6 and NSP1 genes from these samples presented similarity
38 values below 78% and 66.6%, respectively, to the recognized prototypes from each
39 gene. So, we submitted the VP6 and NSP1 sequences to the Rotavirus
40 Classification Working Group that confirmed the identification of a new I18 and A19
41 genotypes. There was no history of rotavirus vaccination and children and adults in
42 general had mild symptoms.

43 *Conclusion:* Our analysis shows a G3P[9] rotavirus strain bearing VP6 and NSP1
44 genes assigned to new I18 and A19 genotypes, respectively. These findings
45 highlight the great genetic diversity and the potential for evolution of rotavirus
46 strains infecting humans.

47

48 *Keywords:* Rotavirus G3P[9], VP6 genotype I18, NSP1 genotype A19, African-
 49 descendant

50

51 **1. Background**

52 Rotavirus is a major cause of acute gastroenteritis affecting mainly children
 53 under five years old. Adults can also be infected but in general do not develop
 54 symptoms. Rotavirus belongs to the family *Reoviridae* and consists of 11 genome
 55 segments of double-stranded RNA (dsRNA). The virion comprises six structural
 56 proteins (VP1-4, VP6 and VP7), and six non-structural (NSP1-NSP5/6) proteins.^{1,2}

57 A recently nomenclature adopted relies on the characterization of the 11
 58 nucleotide genomic segments named Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x =
 59 Arabic numeral indicating the number of genotype), representing the genotypes of
 60 respective genes VP7, VP4, VP6, VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 and
 61 NSP5/6.² As based on this classification, the Rotavirus Classification Working
 62 Group (RCWG) currently recognizes 27G (VP7), 37P (VP4), 17I (VP6), 9R (VP1),
 63 9C (VP2), 8M (VP3), 18A (NSP1), 10N (NSP2), 12T (NSP3) 14E (NSP4) and 11H
 64 (NSP5) genotypes.² The characterization of the 11 nucleotide genomic segments
 65 proposed by the RCWG can lead to identification of potential new genotypes and
 66 the full genomic characterization that makes up a constellation.²

67 In Brazil, the monotype G1P[8] vaccine (Rotarix, GlaxoSmithKline Biologicals,
 68 Melbourne, Victoria, Australia) was introduced into the Brazilian Public Health
 69 System (SUS) in March 2006. After the introduction of Rotarix, the prevalence of
 70 G1P[8] genotype was found to decrease.³ For G3 genotype the most common
 71 combination was G3P[8] and G3P[4]. Furthermore, high prevalence rates of G3P[8]

72 and G3P[NT] were found in the southeast region of Brazil³ and strains considered
73 unusual genotypes such as G3P[9], G3P[6] and G3P[3].^{3,4}

74

75 **2. Objective**

76 In this study we characterized the novel VP6 and NSP1 genotypes of a rare
77 G3P[9] strain detected during an outbreak of diarrhea that occurred in an African
78 descendant semi-closed community of the state of Pará, Brazil.

79

80 **3. Study design**

81 During an outbreak of diarrhea that occurred in July 2010, seven RVA (18.9%)
82 of 37 samples were characterized as G3P[9] genotype, all of which collected in the
83 Abacatal Quilombola Community. This is a rural and semi-closed community that
84 gathers African-descendants slaves, being located within the metropolitan area of
85 Belém, Northern Amazon region, Brazil.

86

87 **4. Results**

88 RVA G3P[9] was detected in 35.7% (5/14) of the diarrheic subjects and in 8.7%
89 (2/23) of non-diarrheic individuals ($p=0.2104$). This genotype was found in 13.0%
90 (3/23) of children <10 years and 28.6% (4/14) of adults >11-86 years ($p=0.4190$).
91 There was no history of rotavirus vaccination and children and adults in general
92 had mild symptoms (diarrhea, vomiting, fever and abdominal pain).

93 The samples were screened first by immunochromatographic test (RIDA QUICK
94 Rotavirus, R-Biopharm AG, Germany) and the extraction of viral RNA was applied
95 to positive samples and performed according to the method described by Boom et

106 al⁵. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of dsRNA genome was performed
 107 with subsequent silver staining of the gel.⁶ Seven RVA samples (QUI-15-F11, QUI-
 108 35-F5, QUI-67-F3, QUI-135-F1, QUI-139-F1, QUI-140-F1 and QUI-146-F1)
 109 displayed typical long RNA pattern by PAGE.

110 The reverse transcription of dsRNA was carried out with SuperScript (Invitrogen,
 111 Carlsbad, CA) using specific primers for VP4, VP7, VP6 and NSP1 gene⁷⁻¹¹ and the
 112 PCR amplification was performed with Taq DNA polymerase recombinant
 113 (Invitrogen).

114 The VP6 (1356 bp) and NSP1 (1565bp) PCR amplicons obtained were cloned
 115 into Puc 19 vector using TA Cloning Kit (Invitrogen). The cloned strains were
 116 subsequently amplified by PCR using M13F/M13R primer. The PCR amplicons
 117 obtained were purified using the commercial EasyPrep PCR Clean-Up Mini Kit
 118 (Easypath, Brazil, Erviegas, EasyGen), following the manufacturer's instructions,
 119 and sequenced in both directions using the BigDye Terminator Cycle Sequencing
 120 Ready Reaction Kit (v.3) and ABI Prism Model 3130xl DNA Sequencer (Applied
 Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA).

112 The sequences of the VP4, VP7, VP6 and NSP1 genes were aligned and edited
 113 in BioEdit program (v7.0.5.3) and compared to those available in the GenBank
 114 database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and subjected to
 115 phylogenetic analysis using MEGA5 (v5.0.1.102). The calculated matrix distances
 116 were analyzed using the Neighbor-joining algorithm based on the estimation
 117 method of Kimura 2-parameter for nucleotides and calculating your robustness by
 118 Bootstrap method with 2000 pseudo-replicates.

119 The nucleotide sequences determined in this study were submitted to GenBank
 120 (www.ncbi.nlm.nih.gov). The GenBank accession numbers of the nucleotide

121 sequences are as follows: VP4 (KF185106, KF360205-KF360210), VP7
 122 (KF185108, KF360216-KF360221), VP6 (KF185107, KF360211-KF360215) and
 123 NSP1 (KF185099, KF360199- KF360204).

124 The NSP1 and VP6 sequences showed identities below the cut-off value when
 125 compared to sequences belonging to the established RVA genotypes. As to the
 126 NSP1 gene this similarity with 18 described genotypes ranged from 48.5% to
 127 66.6%. The percentage identity cut-off value for NSP1 is 79%. With regards to VP6
 128 gene the similarity with 17 described genotypes ranged from 58.5% to 78%. The
 129 percentage identity cut-off value for VP6 is 85% (data not showed).

130 We submitted the NSP1 and VP6 sequences of the human
 131 RVA/Humanwt/BRA/QUI-35-F5/2010/G3P[9] to the RCWG that confirmed the
 132 identification of a new A19 and I18 genotypes, according to the rotavirus group A
 133 classification and nomenclature guidelines.²

134 The phylogenetic analyses of VP6 and NSP1 genes for G3P[9] strain were
 135 performed with the RVA/Human-wt/BRA/QUI-35-F5/2010/G3P[9] as prototype for
 136 I18 and A19 genotypes, respectively. All the G3P[9] strains from Abacatal
 137 Quilombola Community clustered with the I18 and A19 genotypes from
 138 RVA/Humanwt/BRA/QUI-35-F5/2010/G3P[9] strain (Figure 1).

139

140 5. Discussion

141 The G3P[9] genotype is a rare strain with a worldwide prevalence of <0.2% and
 142 may have a feline/canine origin, or derive from multiple reassortments involving
 143 canine, feline, and human rotaviruses.¹² Nevertheless, the prevalence of G3P[9] in
 144 Brazil is found to be high in the State of Rio de Janeiro^{13,14} and apparently rare in
 145 the country's north (Amazon) region.¹⁵

146 The frequency of G3P[9] genotype in Rio de Janeiro, from 1997 to 1999, was
 147 5.9%.⁴ However, between the years 1996-2006, the frequency of G3P[9]
 148 decreased to 2.46% and showed a variable combination of the VP6 and NSP4
 149 gene, such as G3-P[9]-I1-E1 (50%), G3-P[9]-I2-E2 (25%) and G3-P[9]-I3-E3
 150 (25%).¹⁴ These results differ from our results since the observed frequency in
 151 Quilombola community was 18.9%. In addition, G3P[9] has been described with
 152 different gene combinations, which can be observed for Quilombola samples
 153 considering the new VP6 and NSP1 genotypes reported.

154 The G3P[9] genotype is rare in the Amazon region, Brazil. In a study conducted
 155 in Belém, Pará, between 1992-2006, only one G3P[9] RV10109 strain was
 156 detected.¹⁵ This strain was isolated in 2006 from a child with diarrhea. The
 157 phylogenetic analysis determined the following genotypic constellation G3-P[9]-Ix-
 158 R2-C2-M2-A3-N1-T3-E3-H3 for RV10109 strain. These data suggest possible
 159 feline/canine origin or multiple reassortment events¹⁵ which is different for our
 160 results which suggest a human origin to VP4 and VP7 genes for the
 161 G3P[9]samples.

162 The G3P[9] Quilombola samples gathered in July 2010, suggesting a self
 163 limiting outbreak. Interestingly, adults were more affected and all individuals
 164 infected by G3P[9] presented mild symptoms; however, these results may have
 165 occurred by chance owing to the small sample size.

166 In the present study we characterized novel VP6 and NSP1 genotypes of rare
 167 RVA G3P[9] strain. However, the characterization of all segments genomics is
 168 necessary for understanding the great genetic diversity of rotavirus maintained by
 169 multiple reassortment events. The emergence of novel rotavirus strains during the

170 post vaccine period may pose a challenge to vaccination strategies and highlight
171 the importance of surveillance of gastroenteritis episode in this community.

172

173 **Acknowledgements**

174 We thank all parents and children from Abacatal Quilombola Community who
175 enroll in this study and the Instituto Evandro Chagas by support physician and
176 laboratory team.

177

178 **Funding**

179 This study was supported by a grant from the Fundação de Amparo à Pesquisa
180 do Estado do Pará (MS/CNPq/SECTAM n. 032/2007) and Pró-Reitoria de
181 Pesquisa e Pós-Graduação/UFPA (PROPESP/UFPA) and Fundação de Amparo e
182 Desenvolvimento da Pesquisa (FADESP). J.H.L.K was supported by Conselho
183 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

184

185 **Conflicts of interest**

186 None declared

187

188 **Ethical approval**

189 This study had the approval granted by The Ethics Committee on Human
190 Research of the Evandro Chagas Institute (IEC-CEPH) under number 009/2007.
191 The ethical consent form was also applied to the subjects of this research.

192

193

194

References

1. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 2011;**156**(8):1397-413.
2. Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol* 2008;**153**(8):1621-9.
3. Leite JPG, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;**103**(8):745-53.
4. Luchs A, Cilli A, Morillo SG, Carmona RCC, Timenetsky MCST. Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: Possible human–canine interspecies transmission. *J Clin Virol* 2012;**54**(1):89-92.
5. Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Wertheim-Vandillen, P.M.E.; Van der Noordaa. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;**28**(3):495-503.
6. Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Barth OM, Suttmoller F, de Farias V, et al. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1983;**78**(4):483-90.
7. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;**30**(6):1365-73.

- 219 8. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, et al.
 220 Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from
 221 stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990;**28**(2):276-82.
- 222 9. Iturriza Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular
 223 characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of
 224 genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol*
 225 2002;**76**(13):6596-601.
- 226 10. Both GW, Siegman LJ, Bellamy AR, Ikegami N, Shatkin AJ, Furuichi Y.
 227 Comparative sequence analysis of rotavirus genomic segment 6-the gene
 228 specifying viral subgroups 1 and 2. *J Virol* 1984;**51**(1):97-101.
- 229 11. Nakagomi O, Kaga E. Distinctness of NSP1 gene of human rotavirus AU-1 from
 230 NSP1 gene of other human genogroups. *Res Virol* 1995;**146**(6):423-8.
- 231 12. Bányai K, László B, Duque J, Steele AD, Nelson EA, Gentsch JR, Parashar
 232 UD. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain
 233 diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of
 234 rotavirus vaccination programs. *Vaccine* 2012;**27**(30 Suppl 1):A122-30.
- 235 13. Santos N, Soares CC, Volatão EM, Albuquerque MCM, Hoshino Y. Surveillance
 236 of Rotavirus Strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol*
 237 2003;**41**(7):3399-402.
- 238 14. Benati FJ, Maranhão AG, Lima RS, Silva RC, Santos N. Multiple-gene
 239 characterization of rotavirus strains: evidence of genetic linkage among the VP7,
 240 VP4-, VP6-, AND NSP4-encoding genes. *J Med Virol* 2010;**82**(10):1797-802.
- 241 15. Maestri RP, Kaiano JHL, Neri DL, Soares LS, Guerra SFS, Oliveira DS, Farias
 242 YN, Gabbay YB, Leite JPG, Linhares AC, Mascarenhas JDP. Phylogenetic
 243 analysis of probable non-human genes of group A rotavirus isolated from

244 children with acute gastroenteritis in Belém, Brazil. *J Med Virol*
245 2012;**84**(12):1993-2002.

246

247

248

249 **Figure 1.** Dendrogram based on the coding region nucleotide sequences of the
250 NSP1 gene (A) and VP6 gene (B). The numbers adjacent to the nodes represent
251 the percent bootstrap support for that cluster. Bootstrap values lower than 70% are
252 not shown. The calibration bar indicates substitutions per nucleotide. NSP1 and
253 VP6 strains analyzed in this study are in bold.

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

