



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

AMANDA CAMPOS CAETANO

Identificação de astrovírus não clássicos na região Centro-Oeste

**Goiânia
2019**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Amanda Campos Caetano

Título do trabalho: Identificação de astrovírus não clássicos na região Centro-Oeste

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Amanda C. Caetano
Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Mariana
Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 30 / 07 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Versão atualizada em setembro de 2017.

² A assinatura deve ser escaneada.

AMANDA CAMPOS CAETANO

Identificação de astrovírus não clássicos na região Centro-Oeste

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia da
Relação Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás
para obtenção do Título de
Mestre

Orientador(a): Prof^a Dr^a Menira
Borges de Lima Dias e Souza

**Goiânia
2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Caetano, Amanda Campos
Identificação de astrovírus não clássicos na região Centro-Oeste [manuscrito] / Amanda Campos Caetano. - 2019.
LXVIII, 68 f.

Orientador: Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2019.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Astrovírus não clássicos. 2. Gastroenterite. 3. HAstV-MLB. 4. Semi-Nested PCR. I. Souza, Menira Borges de Lima Dias e , orient. II. Título.

CDU 578



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE AMANDA CAMPOS CAETANO- Aos vinte e seis dias do mês de junho do ano de 2019 (26/06/2019), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. MENIRA BORGES DE LIMA DIAS E SOUZA, MÁRCIA ALVES DIAS DE MATOS e HUGO DELLEON DA SILVA para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“Primeira identificação de astrovírus não clássicos na região Centro-Oeste do Brasil”**, em nível de MESTRADO, de autoria de AMANDA CAMPOS CAETANO discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. MENIRA BORGES DE LIMA DIAS E SOUZA, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza

Profa. Dra. Márcia Alves Dias de Matos

Prof. Dr. Hugo Delleon da Silva

Aprovada / Reprovada

Aprovada
Aprovada
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 15 h 55 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, Murilo Alves Guedes, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Identificação de astrovírus não clássicos na região Centro-Oeste

Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Sousa – IPTSP/UFG

Profa. Dra. Márcia Alves Dias de Matos – IPTSP/UFG

Prof. Dr. Hugo Delleon da Silva – ICB/UFG

Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

Menira
Márcia Alves Dias de Matos
Murilo Alves Guedes

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-
Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Amanda Campos Caetano

Orientador (a): Dr^a Menira Borges de Lima Dias e Souza

Co-orientador (a):

Membros:

1. Dr^a Menira Borges de Lima Dias e Souza
2. Dr^a Márcia Alves Dias de Matos
3. Dr. Hugo Delleon da Silva

Data: 26/06/2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me permitido chegar até aqui, sempre me iluminando e guiando meu caminho.

Aos meus pais, Sandro e Mara, que sempre se esforçaram para me oferecer uma educação de qualidade e condições para que me dedicasse aos estudos. Pais que sempre apoiaram e respeitaram minhas decisões e que se mostram otimistas em relação ao meu futuro. Vocês representam o verdadeiro significado de família, é uma honra ser sua filha. Obrigada por todo amor e carinho.

À minha orientadora, Menira, que acreditou em mim e me escolheu como mestranda, além de se dedicar incansavelmente para que o estudo fosse exercido da melhor maneira possível, apesar de todas as dificuldades. Admiro muito seu trabalho e todo o seu comprometimento com a ciência e a academia.

Agradeço também a todos os membros do LABVICC as professoras Fabíola e Marcelle aos alunos de IC, mestrado e doutorado, que me proporcionaram uma boa convivência, tornando todo esse tempo no laboratório leve e divertido e principalmente ao apoio nos momentos bons e ruins durante a realização dos experimentos. Christopher, Deborah, Gessyka, Izabela, Maísa, Paulo e Pedro, e toda a “galera da virologia” vou sempre me lembrar com carinhos dos momentos em que passamos juntos.

Agradeço também às pessoas que foram de grande importância na realização desse trabalho, as quais eu tenho um sentimento de gratidão e um apreço imenso. A Gabriela por toda a ajuda na bancada, por ser minha companheira nas disciplinas que cursamos juntas e por todas as conversas. A Fernanda e Nathânia por me ajudarem a resolver quase todos os problemas que surgiram durante esse trabalho, por compartilharem comigo todo o seu conhecimento e me ensinarem tanto. Grande parte da minha experiência adquirida no laboratório foi por conta de vocês, e claro por sempre terem o pensamento positivo e acreditarem que no fim tudo iria dar certo.

Agradeço também aos amigos que essa universidade me proporcionou, a todos os membros do “clubinho”, que aspiram o mesmo amor pela biomedicina e pela ciência.

Aos melhores amigos que o mundo poderia me oferecer. Não existem palavras suficientes para expressar minha gratidão a vocês. Aos meus amigos de longa data Matheus e Victor, nossos caminhos podem ter se afastado por um tempo, mas para minha felicidade eles se cruzaram novamente. Eu olho para trás, vejo aqueles adolescentes, e

fico muito feliz em vê-los se tornando adultos incríveis, obrigada pelas memórias do passado e pelas experiências do presente.

Certa vez me disseram que existe encontro de almas entre pessoas, e de fato a minha se encontrou com esses cristais: Gilvana, Gustavo e Melissa. Uma amizade que surgiu entre pessoas que não possuem tanto em comum, mas que apesar das diferenças se encaixam perfeitamente. Nós sempre estivemos juntos partilhando momentos bons e também nos mais difíceis. Cada um se expressando à sua maneira, seja em nossas conversas existenciais, discussões, desabafos e brincadeiras criou um suporte forte que nos permitiu crescermos juntos. Hoje eu me reconstruí e me fiz mais forte, e nada disso seria possível sem vocês ao meu lado, obrigada.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro (PPGBRPH) pela oportunidade, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás pela bolsa concedida e a toda a equipe do Hospital Materno Infantil que permitiu a realização do trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, QUADROS, TABELAS E ANEXOS

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico	1
1.2. Classificação.....	3
1.3. Características estruturais.....	5
1.4. Ciclo replicativo	7
1.5. Patogenia e aspectos clínicos	9
1.6. Diagnóstico.....	12
1.7. Epidemiologia	13
1.8. Prevenção e Controle.....	16
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo Geral	20
3.2. Objetivos Específicos	20
4. METODOLOGIA	21
4.1. Local de estudo.....	21
4.2. Coleta das amostras	21
4.3. Extração do RNA viral	22
4.4. Síntese de cDNA	22
4.5. Ensaios de RT-PCR e Semi-Nested PCR.....	22
4.6. Sequenciamento molecular.....	24
4.7. Análise das sequências	25
5. RESULTADOS	26
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	32
ANEXOS E APÊNDICES	46

LISTA DE FIGURAS, QUADROS, TABELAS E ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Linha do tempo representando o histórico dos HAstV clássicos e não clássicos	3
Figura 2 – Micrografia eletrônica das partículas de astrovírus humanos	5
Figura 3 – Organização do genoma dos astrovírus humanos, apresentando as regiões de leitura aberta (ORFs)	6
Figura 4 – Produtos proteicos produzidos a partir das poliproteínas nsP1a, nsP1ab e VP90	7
Figura 5 – Ciclo de replicação proposto para os HAstV	9
Figura 6 – Árvore filogenética da sequência parcial (689 pb) da RNA polimerase RNA dependente do HAstV-MLB1	27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Similaridade nucleotídica entre os astrovírus clássicos (HAstV) e não clássicos (HAstV-MLB e HAstV-VA).....	4
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores utilizados nos ensaios de RT-PCR e Semi-Nested PCR	23
Tabela 2 – Características gerais da população de estudo	26

LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética	46
Apêndice 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	52
Apêndice 2 – Ficha de investigação clínica	57

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AstV	Astrovírus
cDNA	DNA complementar
GEA	Gastroenterite aguda
HAstV	Astrovírus Humano
HAstV 1-8.....	Astrovírus Humano sorotipo 1 ao 8
HAstV-MLB	Astrovírus Humano Melbourne
HAstV-VA.....	Astrovírus Humano Virgínia
kDa.....	Quilodalton
MAstV	Mamastrovirus
MLB 1-3	Astrovírus Humano Melbourne 1 ao 3
mM.....	Milimolar
nsP.....	Proteínas não estruturais
nt	Nucleotídeo
nm	Nanômetro
pb	Pares de Base
ORF.....	Regiões de Leitura Aberta (<i>Open Reading Frames</i>)
PCR.....	Reação em cadeia pela polimerase
RdRp	RNA polimerase RNA-dependente
RT-PCR	Reação em cadeia pela polimerase pós transcrição reversa
VA 1-5	Astrovírus Humano Virgínia 1 ao 5
VP	Proteína Viral
μL.....	Microlitro
μM.....	Micromolar

RESUMO

Os astrovírus humanos clássicos (HAstV-1 a HAstV-8) são vírus comumente associados a quadros de gastroenterite em crianças de até cinco anos de idade. Recentemente novas espécies de astrovírus, foram reconhecidas e designadas astrovírus humanos não clássicos, Melbourne (HAstV-MLB) e Virgínia (HAstV-VA), que têm sido também encontrados em associação com gastroenterites e também com quadros clínicos mais graves, tais como meningite e encefalite. Entretanto, ainda são escassos os estudos sobre a ocorrência desde patógenos no Brasil, e até o momento sem relatos na região Centro-Oeste. Assim, investigou-se pela primeira vez a ocorrência de astrovírus não clássicos, nessa região, em amostras de fezes, obtidas entre maio de 2014 e abril de 2015, de crianças de até 6 anos com ou sem sintomas de gastroenterite aguda. As crianças foram atendidas no Hospital Materno Infantil na cidade de Goiânia, Goiás. Para a pesquisa de MLB foi utilizada a reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR), seguida de Semi-Nested PCR tendo como alvo a região 3' final da ORF1b do genoma viral. Foi ainda realizado o sequenciamento genômico e análise filogenética para a caracterização molecular. De 250 amostras testadas, uma foi positiva (0,4%) para astrovírus não clássico, sendo essa caracterizada como HAstV-MLB1. A amostra foi obtida de uma criança de 12 meses de idade que apresentava diarreia e sintomas respiratórios (tosse), além de febre. Este é o primeiro estudo a detectar astrovírus não clássicos em amostras fecais obtidas na região Centro-Oeste. Esperamos que os dados obtidos possam contribuir para um melhor entendimento da epidemiologia molecular e aspectos da patogenia desses agentes na população pediátrica.

Palavras chave: Astrovírus não clássicos, gastroenterite, HAstV-MLB, Semi-Nested PCR

ABSTRACT

The classical human astrovirus (HAstV-1 to HAstV-8) are viruses commonly associated with gastroenteritis in children up to five years of age. Recently new astrovirus species have been recognized and designated as novel astrovirus, Melbourne (HAstV-MLB) and Virginia (HAstV-VA), which have also been found in association with gastroenteritis and other more severe clinical conditions such as meningitis and encephalitis. However, there are still few studies on the occurrence of these pathogens in Brazil, and so far without reports in the Midwest region. Thus, for the first time, novel astrovirus was investigated, in this region, in stool samples obtained between May 2014 and April 2015 from children up to six years-old with or without symptoms of acute gastroenteritis. The children were attended at the Materno Infantil Hospital in the city of Goiânia, Goiás. For the MLB research the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used, followed by Semi-Nested PCR targeting region 3' end of the ORF1b of the viral genome. It was also carried out genomic sequencing and phylogenetic analysis for molecular characterization. From 250 samples tested, one was positive (0.4%) for novel astrovirus and characterized as HAstV-MLB1. The sample was obtained from a 12-month-old child with diarrhea and respiratory symptoms (cough), in addition to fever. This is the first study to detect non-classical astrovirus in stool samples obtained in the Midwest region. We hope that the data obtained may contribute to a better understanding of the molecular epidemiology and aspects of the pathogenesis of these agents in the pediatric population.

Keywords: Novel astrovirus, gastroenteritis, HAstV-MLB, Semi-Nested PCR

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Os primeiros estudos sobre astrovírus (AstV) iniciaram em 1975, quando Madeley e Cosgrove identificaram pequenas partículas virais, de diâmetro entre 28 e 30 nanômetros (nm), de aspecto arredondado e que apresentavam projeções, conferindo ao vírus a aparência de uma estrela (*Astron*, do grego: estrela). Essas partículas foram observadas por microscopia eletrônica, em amostras fecais provenientes de crianças menores de dois anos, com quadros de gastroenterite e em amostras fecais de recém-nascidos, obtidas após um pequeno surto de gastroenterite no Hospital Ruchill na cidade de Glasgow, Escócia (Madeley & Cosgrove 1975).

Em 1981, foi realizado por Lee e Kurtz, o cultivo e isolamento de AstVs em células de rim de embrião humano (HEK) a partir de suspensão fecal de um indivíduo sintomático, sendo possível adaptar esses agentes a se replicarem também em células de rim de macacos Rhesus (LLCMK2) e em células primárias de rim de babuínos (PBK) (Lee & Kurtz 1981).

No ano de 1982, foram caracterizados, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta, os dois primeiros sorotipos de astrovírus humanos (HAstV), associados a quadro de gastroenterite, sendo designados sorotipo 1 e sorotipo 2 (Lee & Kurtz 1982). Em 1984, os HAstV, foram classificados em cinco sorotipos distintos (HAstV 1 a 5), pelo teste imunoenzimático (IFT) (Kurtz & Lee 1984). Com o avanço das técnicas moleculares, em 1994, foi possível se obter a sequência genômica completa do HAstV-1 (Willcocks et al. 1994) e, no ano de 1998, os HAstV foram classificados em oito sorotipos (HAstV 1 a 8) (Matsui et al. 1998). No Brasil, a primeira detecção desse vírus foi feita por imunomicroscopia eletrônica nas fezes de uma criança com diarreia que também excretava rotavírus (Nozawa et al. 1985). Esses HAstV são agora referidos como astrovírus humanos “clássicos”.

Em 2008, Finkbeiner et al, utilizando análises metagenômicas a fim de identificar novos vírus causadores de diarreia, descobriram uma nova espécie pertencente à família *Astroviridae*, a partir de uma amostra fecal, coletada em 1999. A amostra havia sido obtida de uma criança de três anos de idade que apresentava diarreia aguda, na cidade de Melbourne na Austrália. Após o sequenciamento genômico, foi observado que esse vírus apresentava $\leq 67\%$ de similaridade nucleotídica com o genoma de AstV já conhecidos,

tratando-se de uma nova espécie sendo denominada Astrovírus MLB1 (HAstV-MLB1) (Finkbeiner et al. 2008).

Para outras espécies de HAstV existem dois sistemas de nomenclatura devido à caracterização simultânea desses vírus por diferentes pesquisadores, sendo denominados de VA/HMO. Finkbeiner e colaboradores (2009b) descobriram uma nova espécie de AstV em amostras fecais obtidas durante um surto de gastroenterite em uma creche na cidade de Virgínia, EUA. Análises filogenéticas demonstraram que esse novo vírus, apresentava divergência nucleotídica com os HAstV clássicos e também com o AstV-MLB1 (MLB1) que havia sido previamente descrito, sendo mais próximos filogeneticamente a espécies de vírus que infectavam doninhas (MAstV) e ovinos (OAstV), sendo então denominado de Astrovírus VA1 (HAstV-VA1).

Análises moleculares feitas por Kapoor et al. (2009) em amostras fecais de indivíduos com diarreia, paralisia flácida aguda (não-pólio) e indivíduos saudáveis no Nepal, Afeganistão, Paquistão e Nigéria, identificaram outras variantes de AstV. Foram então, reportadas três novas espécies de AstV, as quais eram filogeneticamente relacionadas entre si e também às espécies de MAstV e OAstV sendo denominadas de HMOAstV (do inglês *human-mink-ovine-like astrovirus*) e separadas em espécies A, B e C.

Em outro estudo foram analisadas amostras fecais de crianças com gastroenterite em duas regiões: América do Norte (St. Louis, EUA) e Sul Asiático (Vellore, Índia), sendo detectadas três novas espécies de AstV designados HAstV-VA2 (VA2), HAstV-VA3 (VA3), e HAstV-MLB2 (MLB2) (Finkbeiner et al. 2009a). Em 2013, novos AstV foram detectados em amostras fecais de crianças com ou sem gastroenterite sendo identificado na Índia o HAstV-MLB3 (MLB3), e no Nepal o HAstV-VA4 (VA4) (Jiang et al. 2013).

Mais recentemente, em 2014 análises moleculares de amostras fecais de crianças com diarreia aguda de origem desconhecida em Burkina Faso na África, revelaram um novo vírus inicialmente denominado Burkina Faso 34 (HAstV-BF34) e posteriormente HAstV-VA5 (VA5) (Phan et al. 2014). Juntos esses novos HAstV, chamados de MLB e VA/HMO, formam o grupo denominado de astrovírus “não clássicos”.

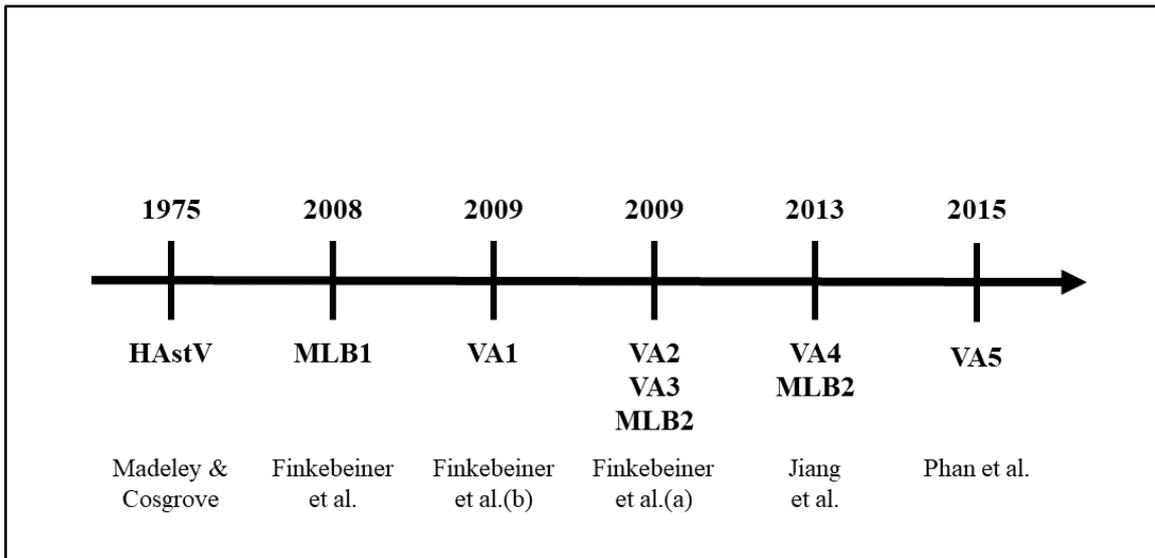


Figura 1 – Linha do tempo representando o histórico dos HAsTV clássicos e não clássicos.

1.2. Classificação

A família *Astroviridae* foi classificada inicialmente pelo Comitê Internacional em Taxonomia dos Vírus (ICTV) em 1995 e no ano de 2004 foi subdividida em dois gêneros: *Avastrovirus* (AAstV) e *Mamastrovirus* (MAstV), já em 2018 essa família foi classificada como pertencente ao reino *Riboviria* (ICTV 2018). O sistema de classificação proposto pelo ICTV *Astroviridae Study Group* em 2010 recomenda que as classificações dos vírus sejam feitas baseados na sequência da região que codifica a proteína do capsídeo e que as variantes das mesmas espécies compartilhem $\geq 75\%$ de identidade entre as proteínas virais (Bosch et al. 2012). A similaridade nucleotídica entre as espécies de HAsTV, MLB e VA estão demonstradas no quadro 1.

Os AstV são divididos em dois gêneros, *Avastrovirus* (AAstV), que infectam aves, e são divididos em três espécies (*Avastrovirus 1*, *Avastrovirus 2*, *Avastrovirus 3*); e o *Mamastrovirus* (MAstV) que são os detectados em mamíferos, como: humanos (*Mamastrovirus 1*), felinos (*Mamastrovirus 2*), suínos (*Mamastrovirus 3*), leões-marinhos (*Mamastrovirus 4 e 11*), caninos (*Mamastrovirus 5*), golfinhos (*Mamastrovirus 7*), doninha (*Mamastrovirus 10*), ovinos (*Mamastrovirus 13*) e morcegos (*Mamastrovirus 12*, e *14 ao 19*) (ICTV 2018).

Comparado com os HAsTV clássicos, os HAsTV não clássicos são muito diversos entre si. Os três clados do MLB pertencem a espécie *Mamastrovirus 6* (MLB1, MLB2 e MLB3), enquanto os vírus do clado VA são divididos em *Mamastrovirus 8* (VA2 e VA4), e *Mamastrovirus 9* (VA1 e VA3) (ICTV 2018).

Quadro 1 – Similaridade nucleotídica entre os astrovírus clássicos (HAstV) e não clássicos (HAstV-MLB e HAstV-VA). (Adaptado de Vu et al. 2017)

Espécie	Clássico	MLB	VA2-VA4	VA1-VA3	VA5
<i>Mamastrovírus</i>	<i>Mamastrovírus 1</i>	<i>Mamastrovírus 6</i>	<i>Mamastrovírus 8</i>	<i>Mamastrovírus 9</i>	Não classificado
Sorotipo/Clado	HAstV1-8	MLB1, MLB2, MLB3	VA2 (HMO-A) e VA4	VA1 (HMO-C) e VA3 (HMO-B)	VA5
*ORF1a (protease e proteínas não estruturais)					
Clássico	100	-	-	-	-
MLB	32,8	100	-	-	-
VA2-VA4	24,1	29,1	100	-	-
VA1-VA3	24,2	28,9	67,4	100	-
VA5	23,9	28,2	61,5	59,6	100
ORF1b (RNA polimerase RNA dependente)					
Clássico	100	-	-	-	-
MLB	54,5	100	-	-	-
VA2-VA4	51,8	49,4	100	-	-
VA1-VA3	53,0	49,3	73,7	100	-
VA5	52,2	50,7	74,0	71,5	100
ORF2 (proteínas do capsídeo)					
Clássico	100	-	-	-	-
MLB	27,5	100	-	-	-
VA2-VA4	24,0	21,9	100	-	-
VA1-VA3	23,0	22,1	51,9	100	-
VA5	23,8	20,6	58,9	53,1	100

*ORF (do inglês, *open reading frame*)

Similaridade está representada em porcentagem (%)

1.3. Características Estruturais

As partículas de AstV medem cerca de 40 nm de diâmetro, possuem capsídeo de simetria icosaédrica, não possuem envelope e apresentam projeções na sua superfície que se assemelham a uma estrela de cinco ou seis pontas (Méndez & Arias 2013). Os vírus excretados nas fezes podem medir entre 28 a 30 nm (Figura 1), enquanto os que se replicam em células em cultura possuem maior diâmetro, podendo medir até 41 nm, considerando as projeções na superfície da partícula (Risco et al. 1995).

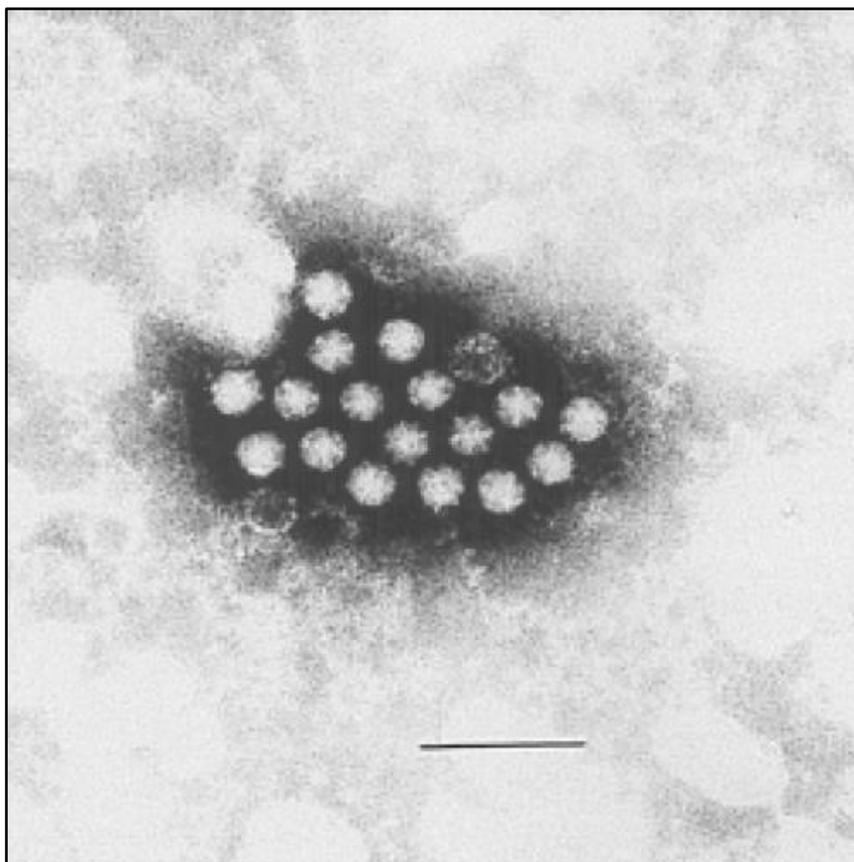


Figura 2 – Micrografia eletrônica das partículas de astrovírus humanos. Escala = 100 nm. (Fonte: Méndez & Arias 2013).

O genoma dos AstV consiste em uma molécula de RNA fita simples polaridade positiva (+fsRNA), de aproximadamente 6,8 quilobases (kb), excluindo a cauda poli A. As porções terminais do genoma possuem regiões não traduzidas (do inglês, *untranslated region* - UTR) nas extremidades 5' e 3', além da cauda poli A, formada por cerca de 30 adeninas (Bosch et al. 2014) e a VPg (do inglês, *viral protein genome-liked*) ligada covalentemente a porção 5' do genoma (Fuentes et al. 2012).

O RNA dos AstV também possui uma região caracterizada por estar associada à mudança de quadro de leitura, denominada de “ribosomal frameshift” (RFS); a qual é essencial na tradução da RNA polimerase RNA-dependente (do inglês – *RNA-dependent RNA polymerase* – RdRp), permitindo a tradução de mais de um tipo de proteína a partir de um mesmo RNA mensageiro (RNAm). Enquanto os poliribossomos estão traduzindo o RNAm eles encontram essa estrutura que promove o seu deslocamento para frente ou para trás, fazendo com que encontre o próximo códon de iniciação, resultando em um produto proteico distinto (Jiang et al. 1993; Marczinke et al. 1994). Existe outra região bem conservada no genoma dos AstV denominada de *stemloop II*, estrutura secundária presente no genoma dos HAstV. Essa estrutura é formada quando duas regiões palindrômicas da mesma molécula e formam pares que dão origem ao loop; sugere-se que esse *stemloop* possa atuar na estabilidade do RNA e interagir com proteínas virais e celulares essenciais para a replicação genômica (Jonassen et al. 1998).

O genoma é subdividido em três regiões de leitura aberta (do inglês – *open reading frame* – ORF), nomeadas da extremidade 5’ à 3’, ORF1a, ORF1b e ORF2 (Figura 3).

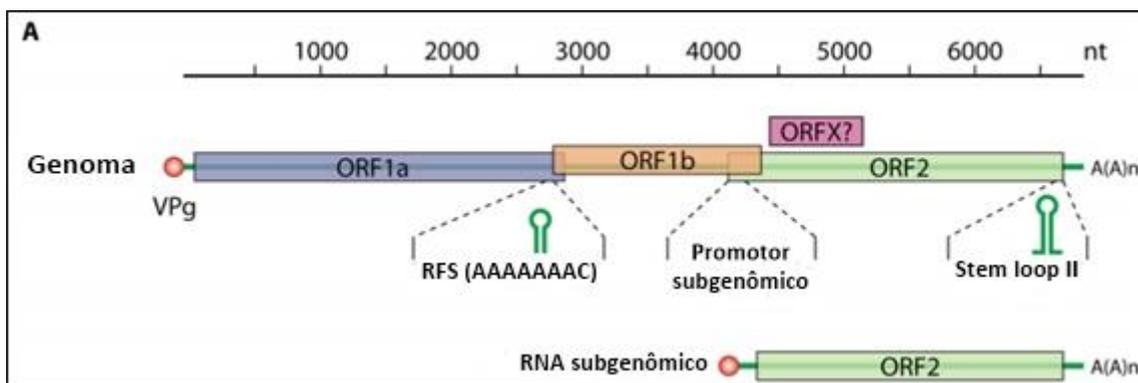


Figura 3 - Organização do genoma dos astrovírus humanos, apresentando as regiões de leitura aberta (ORFs) (Fonte: adaptado de Bosch et al. 2014).

As regiões ORF1a e ORF1b codificam proteínas não estruturais (nsPs). A proteína nsP1a é codificada pela ORF1a, já a nsP1ab é codificada pela ORF1a e ORF1b. Ambas são importantes para a transcrição e replicação. A ORF2 codifica a proteínas estrutural VP90, expressa por RNAs subgenômicos, responsável pela montagem do capsídeo. A nsP1a codifica os domínios da helicase (HEL), transmembranas (TM), coiled-coil (CC), e o domínio da protease (PRO), além da VPg, uma região hipervariável (HVR), sinal de localização nuclear (NLS) e um domínio de morte (DD), enquanto a nsP1ab codifica a RdRp (Bosch et al. 2014). A proteína estrutural VP90, codificada pela ORF2, possui

regiões conservadas (domínios do capsídeo), uma região variável (projeções do capsídeo) e uma região C-terminal (precursora da VP70) (Figura 4) (Monroe et al. 1993).

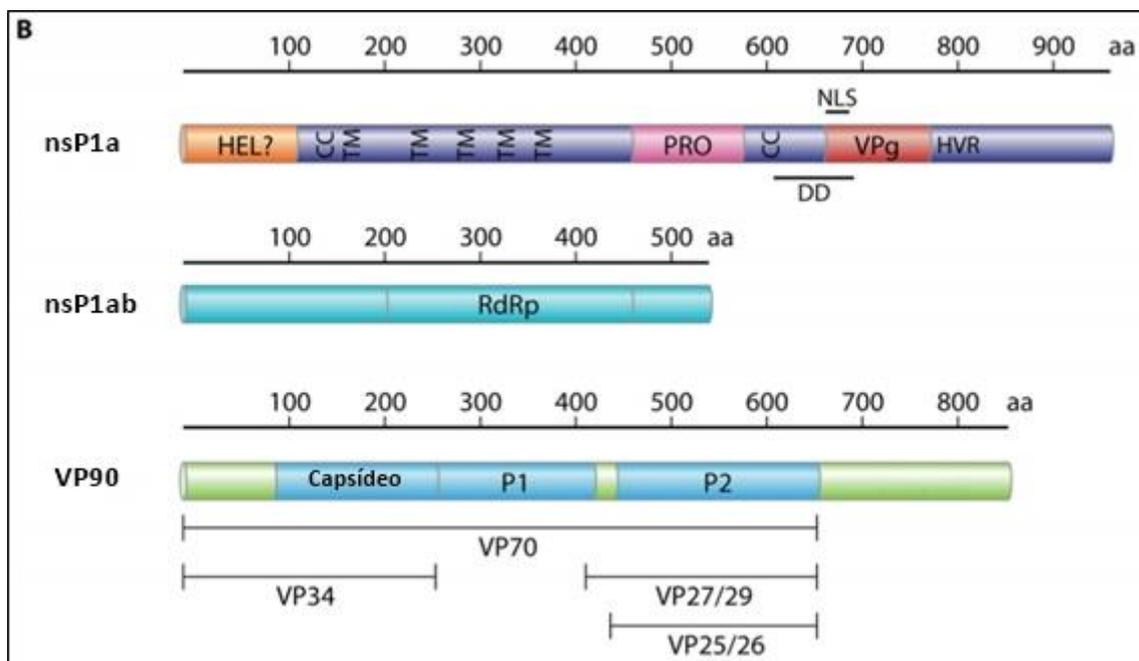


Figura 4 –Produtos proteicos produzidos a partir das poliproteínas nsP1a, nsP1ab e VP90 (Fonte: adaptado de Bosch et al. 2014).

Uma nova ORF, denominada ORFX foi observada no genoma dos HAstV e em outras espécies pertencentes ao gênero MAstV. Esse gene sobrepõe a região 5' da ORF2 no quadro de leitura +1. Sendo um gene sobreposto, onde a mesma sequência de nucleotídeos codifica duas ou mais proteínas em diferentes quadros de leitura, sugere-se que essa ORFX atue como uma forma de auxiliar na codificação de proteínas e regulação de expressão gênica, especialmente em genomas compactos como os AstV (Firth & Atkins 2010) (Figura 3).

1.4. Ciclo Replicativo

Não se sabe ainda qual o receptor celular específico para os HAstV. Entretanto, foi observado que diferentes sorotipos de HAstV, possuem diferentes tropismos, sugerindo que o vírus possa apresentar mais de um tipo de receptor/co-receptor nas células-alvo (Brinker et al. 2000). Observações em células HEK239 indicam que, após a adsorção ao receptor, a entrada da partícula viral na célula ocorre por endocitose dependente de clatrina (Donelli et al. 1992). Além disso, a entrada e o desnudamento viral dependem da diminuição do pH e maturação do endossoma (Méndez et al. 2012). Foi

estimado que o tempo de ligação do vírus ao receptor dure cerca de 10 minutos enquanto o processo de desnudamento da partícula se aproxime de 130 minutos (Méndez et al. 2012). O processo de entrada do vírus também é associado à ativação das vias de quinases dependentes de estresse extracelular, ERK1/2 e PI3K, ambos sendo necessários para entrada e infecção efetiva (Tange et al. 2013; Méndez et al. 2014).

O genoma viral é então traduzido, com ação importante da proteína VPg, que modula a tradução do mRNA interagindo com os fatores iniciadores de tradução, assim como nos calicivírus (Thorne & Goodfellow 2014), dando origem a duas poliproteínas não estruturais, nsP1a ~101 quilodaltos (kDa), produto da região ORF1a e nsP1ab (160 kDa), produto das regiões ORF1a e ORF1b. Essas duas proteínas sofrem clivagens por proteases celulares e virais, dando origem a proteínas menores, as quais atuam na replicação do genoma viral (Matsui & Kiang 2002). As proteínas nsP1a/4, RpRd e a VPg interagem e contribuem para a produção de fitas negativas e positivas de RNA. As fitas negativas são transcritas em RNAs subgenômicos, sendo traduzidos na proteína estrutural. As fitas positivas são traduzidas em mais proteínas não estruturais ou encapsidadas como genoma viral (Bosch et al. 2014).

A tradução da ORF2 dá origem a poliproteína VP90 de aproximadamente 90 kDa, a qual é sintetizada a partir de um RNA subgenômico. Essa poliproteína estrutural atua na morfogênese da partícula viral em associação com a membrana intracelular; em seguida ocorre a ação das capazes que clivam a proteína VP90, transformando-a em uma proteína menor de 70 kDa (VP70) (Mendez et al. 2002), o que resulta na maturação dos vírions. Para que essas partículas se tornem infecciosas é necessário que a VP70 seja clivada pela tripsina. A VP70 é clivada então em três produtos menores: VP32, responsável pela formação do capsídeo, VP29 e VP26, as quais dão origem as projeções virais (Bass & Qiu 2000; Méndez et al. 2012).

As partículas virais são montadas inicialmente pela associação da VP90 em torno do genoma, resultando em uma partícula viral imatura. O processo de clivagem da VP90 em VP70 além de ativar a infecciosidade da partícula viral também se faz necessário para que o vírus seja liberado da célula, sem que ocorra lise celular (Méndez et al. 2004; Bosch et al. 2014).

Testes *in vitro* mostraram que os HAstV estão associados ao aumento da permeabilidade da membrana celular causada pela interação entre as proteínas do capsídeo com as integrinas que existem nas junções entre membranas das células, e que esse efeito é independente da replicação viral (Moser et al. 2007). Foi ainda observado que as proteínas do capsídeo encontradas no HAstV-1 se ligam ao receptor C1q e a lectina ligadora de manose, bloqueando a ativação do sistema complemento pela via clássica da lectina (Méndez & Arias 2013).

A realização de testes histopatológicos, obtidos a partir de material de biópsias intestinais, realizadas em crianças imunocomprometidas infectadas por HAstV que apresentavam diarreia, demonstrou que a infecção por AstV localiza-se no intestino delgado, principalmente no jejuno (Sebire 2004).

A infecção por HAstV pode ser sintomática ou assintomática. Os sintomas gastroentéricos causados pelos HAstV geralmente são agudos e autolimitados. Entretanto, em determinados indivíduos a infecção pode causar quadros mais graves com quadro sistêmico (Cortez et al. 2017; Johnson et al. 2017). As complicações são principalmente descritas em pessoas idosas (Marshall et al. 2007; Jarchow-macdonald et al. 2015) e indivíduos imunocomprometidos. Alguns estudos mostram a relação entre a presença de partículas de HAstV nas fezes e quadros mais graves de diarreia em pacientes adultos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes que realizaram transplante de medula óssea (Grohmann et al. 1993; Cox et al. 1994; Gallimore et al. 2005) e recém-nascidos prematuros com enterocolitene necrosante (ENC) (Bagci et al. 2008).

A presença de HAstV no sistema nervoso central (SNC) de um paciente de 15 anos de idade, portador de agamaglobulinemia, uma anomalia ligada ao cromossomo X também foi reportada, resultando em óbito em decorrência de encefalite. Após a realização de biópsia do córtex frontal desse paciente, foi observada expressão de proteínas estruturais de um isolado denominado HAstV Puget-Sound (HAstV-PS), que era geneticamente relacionado ao HAstV-VA1, localizadas principalmente nos astrócitos. Também foram detectadas outras alterações no cérebro como degeneração neuronal grave, infiltrações de linfócitos T e macrófagos além de astrócitos hipotróficos (Quan et al. 2010).

Um estudo do tipo caso controle, realizado com amostras obtidas na cidade de Vellore, Índia, mostrou que a presença de MLB1 pode não estar relacionada a quadros de

diarreia. Das amostras analisadas foi detectado o MLB1 em 3% das amostras de pacientes sem diarreia, e em 1% dos pacientes com diarreia. Mesmo com essas diferenças de quadro clínico, quando avaliada a carga viral, observou-se que o número de partículas virais de MLB1 presentes nas amostras clínicas não diferiam entre indivíduos com diarreia (7×10^3) ou sem diarreia (4×10^4) (Holtz et al. 2011a).

Um estudo de Holtz et al. (2011b), detectou o MLB2 no plasma de uma criança de 20 meses de idade, que apresentava febre associada a quadro de infecção respiratória, assim, os pesquisadores hipotetizaram que o MLB2 possa estar associado a doenças respiratórias. Nenhum outro patógeno foi encontrado nas amostras, sugerindo que o MLB2 foi o responsável pelo quadro febril do paciente. Um outro estudo também detectou o MLB2 no swab nasal de crianças com quadro febril (Wylie et al. 2012). Esses dados reforçam que a infecção dos MLBs não esteja restrita apenas ao trato gastrointestinal, sendo assim importantes mais estudos sobre a patogênese desses agentes.

Cordey et al. (2016b) realizou uma pesquisa com o objetivo de determinar a etiologia da meningoencefalite e de doenças respiratórias por meio de sequenciamento de nova geração. A presença do MLB2 foi identificada em um dos pacientes com quadro de meningite aguda, sendo encontradas partículas virais no líquido cefalorraquiano, plasma, urina e *swab* anal do paciente. A partir desse caso, foi então realizada uma triagem para MLB2, em 934 amostras fecais de 615 pacientes e 424 amostras de líquido cefalorraquidiano de outros 404 pacientes previamente hospitalizados, sendo identificado um segundo paciente com quadro de meningite, com resultados positivos nas fezes e plasma. Adicionalmente foi identificado o MLB2 nas amostras fecais de outros cinco pacientes pediátricos, sendo um imunocompetente e quatro imunocomprometidos. Os dados obtidos sugerem que este vírus possa se disseminar para além do sistema digestório.

Em relação aos VAs, a presença do VA1 foi relacionada a quadros de encefalite em pacientes imunocomprometidos (Brown et al. 2015; Frémond et al. 2015; Naccache et al. 2015; Lum et al. 2016). Foi reportada a presença do VA1 em um paciente de quatro anos de idade diagnosticado com doença celíaca e que apresentava quadro de gastroenterite (Smits et al. 2010) e também a presença do VA3 em soro de pacientes com hepatite de etiologia desconhecida (Gonzales-Gustavson et al. 2017).

As partículas de HAstV são excretadas nas fezes, com as maiores taxas sendo detectadas no sexto dia após a infecção (Méndez & Arias 2013). Em relação a carga viral dos sorotipos (1, 2, 3, 4 e 8), as médias variaram entre $3,4 \times 10^8$ a 1×10^{13} por grama de

fezes, sendo detectadas cargas mais elevadas para o sorotipo 3, quando comparado aos demais, sendo esse sorotipo associado a um quadro mais grave de gastroenterite (Caballero et al. 2003).

Dados epidemiológicos indicam que a maioria das crianças adquirem imunidade contra os HAstV antes de completarem cinco anos de idade, sendo que a maioria delas apresentam anticorpos contra o HAstV-1 (Kriston et al. 1996; Koopmans et al. 1998). A maior parte dos anticorpos contra o sorotipo 1 e 3 são encontrados em crianças menores de dois anos de idade, enquanto que anticorpos específicos para os sorotipos 4 e 8 são encontrados mais frequentemente em crianças maiores de três anos. Isso sugere que a resposta imune contra os sorotipos mais comuns, geralmente estimulada nos primeiros anos de vida, falha em apresentar uma proteção contra novos sorotipos ou variantes (Guix et al. 2002).

1.6. Diagnóstico

Para o diagnóstico laboratorial da infecção por HAstV utiliza-se amostras fecais obtidas na fase aguda. Podem ser utilizados métodos de detecção da partícula inteira como a microscopia eletrônica (ME) ou imunomicroscopia eletrônica (Madeley & Cosgrove 1975), ensaios imunoenzimáticos (EIA) (Fodha et al. 2006) e testes de imunocromatografia para a pesquisa de antígenos virais. Em um estudo foi demonstrado que o uso do kit de imunocromatografia, pode ser uma alternativa mais rápida para a triagem de HAstV clássicos diretamente das amostras fecais de pacientes e apresentando o resultado entre 15 a 20 minutos (Khamrin et al. 2010). Entretanto, a confirmação dos casos positivos deve ser realizada com a utilização de um método molecular.

Com o advento das técnicas moleculares, que tem como alvo a amplificação do genoma viral, surgiram novas possibilidades de ensaios que aumentam a sensibilidade e especificidade no diagnóstico de AstV em amostras fecais como: Reação em cadeia da polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR), seguido de Nested ou Semi-Nested PCR, PCR em tempo real e sequenciamento de nova geração, para detecção do vírus e podendo ainda serem utilizados o sequenciamento genômico e análise filogenética para melhor caracterização dos AstVs (Noel et al. 1995; Dai et al. 2010; Cordey et al. 2016a) A técnica de RT-PCR continua sendo a técnica mais utilizada por laboratórios de pesquisa, para a triagem e genotipagem do HAstV (Verma et al. 2010; Khamrin et al. 2016). Para realizar a identificação dos sorotipos de HAstV 1 a 8, o uso dos iniciadores Mon244/Mon245 e

Mon269/Mon270, que têm como alvo a região 5' da ORF2, são os mais utilizados (Noel et al. 1995).

Com a descoberta dos HAstV não clássicos, os principais alvos dos iniciadores utilizados para a detecção do vírus são as regiões codificantes e bem conservadas do genoma. Para os MLBs a extremidade 3' da ORF1b e para os VAs a extremidade 5' da ORF2 (Hata et al. 2015).

O ensaio de microarranjo também se mostrou uma ferramenta útil na detecção e caracterização dos HAstV. Um estudo mostrou que um ensaio de microarranjo que utiliza sondas de oligonucleotídeos para os oito sorotipos pode ser usado para distinguir os diferentes sorotipos de HAstV clássicos (Brown et al. 2008), enquanto a plataforma de microarranjo “Combimatrix” é capaz de detectar diferentes vírus gastroentéricos como AstV, adenovírus, norovírus e rotavírus de forma simultânea (Kim et al. 2012). Entretanto, esses métodos possuem ainda um elevado custo, o que torna seu uso ainda limitado.

O diagnóstico de HAstV clássicos e não clássicos em sua maioria são restritos a centros de pesquisa, não disponíveis em laboratórios de rotina e sua importância como agentes etiológicos de gastroenterites em casos hospitalares e surtos permanece pouco compreendida, com poucos estudos, principalmente em relação aos não clássicos.

1.7. Epidemiologia

Como referido, os HAstV são transmitidos pela via fecal-oral (Kurtz et al. 1979; Midthun et al. 1993; Méndez & Arias 2013), sendo que água e alimentos contaminados atuam como os principais veículos de transmissão (Bosch 2007; Koopmans 2008). Portanto, surtos de HAstV não são incomuns. Na cidade de Katano, Japão, a infecção por HAstV acometeu crianças e adultos em 14 escolas que receberam alimentos fornecidos por três cozinhas em comum (Oishi et al. 1994). Foi identificado também a infecção por HAstV, e outros vírus entéricos, em um surto de gastroenterite ocorrido na França em pessoas que consumiram ostras, encontrando os HAstV nas amostras fecais e também nos animais (Guyader et al. 2008). Entre os alimentos envolvidos em surtos encontram-se os mexilhões, demonstrando que o cultivo de frutos do mar em águas contaminadas pode resultar em casos de gastroenterite por estes agentes (Vilariño et al. 2009).

A comercialização de alimentos frescos e prontos para o consumo tem aumentado significativamente entre a população, devido a praticidade e ao desejo de uma

alimentação mais saudável, os tornando um possível veículo de transmissão de infecção alimentar (Mir et al. 2018). A contaminação desses alimentos pode estar associada a água usada na irrigação, solo, fertilizantes orgânicos e manipulação humana (Brassard et al. 2012). Alimentos como hortaliças e algumas frutas já foram reportados em casos de surtos alimentares (Pintó & Bosch 2008). Estes produtos geralmente passam por pouco ou nenhum processamento antes de serem consumidos e agem como veículos na transmissão de vírus entéricos (Bosch et al. 2014).

A presença dos HAstV também já foi detectada em águas de superfícies em uma área onde havia sido reportado surto de gastroenterite (Pintó et al. 1996). Embora o risco de infecção por HAstV no contato com águas poluídas seja menor do que o risco de infecção pela ingestão de água, foi relatado um surto de gastroenterite por HAstV e norovírus entre pessoas que tomaram banho em uma piscina pública na cidade de Helsink, Finlândia (Maunula et al. 2004). Além disso, fômites contaminados com fezes também podem ser implicados na transmissão dos HAstV, principalmente em locais semifechados e com aglomeração de pessoas como creches, hospitais e escolas (Abad et al. 2001).

Os HAstV infectam predominantemente a população infantil (Shastri et al. 1998; Kirkwood et al. 2005), em um espectro que varia principalmente entre recém-nascidos a crianças com até cinco anos de idade, entretanto, um estudo realizado na Espanha mostrou que a maior parte dos indivíduos infectados possuíam menos de cinco anos de idade (Guix et al. 2002). Dados da literatura revelam que as infecções por HAstV são mais comuns entre crianças menores de dois anos (Kim et al. 2019). Foi reportado também a detecção de HAstV entre pacientes imunocomprometidos, idosos que vivem em asilos (Marshall et al. 2007; Jarchow-macdonald et al. 2015), e adultos saudáveis (Belliot et al. 1997; Pager & Steele 2002).

Esses HAstV possuem uma distribuição cosmopolita, sendo o sorotipo HAstV-1 o mais frequentemente detectado em populações de diferentes partes do mundo (Palombo & Bishop 1996; Naficy et al. 2000; Sakamoto et al. 2000; Espul et al. 2004; Gabbay et al. 2007; Nguyen et al. 2008; Verma et al. 2010). A incidência dos HAstV varia de 2 a 9% em quadros de diarreia aguda e não bacteriana em crianças (De Benedictis et al. 2011), porém alcançando picos de até 61% dependendo da população (Maldonado et al. 1998).

A idade da primo-infecção por HAstV pode variar por vários motivos, como saneamento básico, higiene e hábitos alimentares. Em estudos conduzidos em amostras fecais de crianças dos Estados Unidos, França e Japão, foram encontrados índices de

positividade para HAstV nas fezes que variou de 6,9% nos EUA, 1,8% na França e 1,7% no Japão (Shastri et al. 1998; Tran et al. 2010; Jeong & Jeong 2012).

Um estudo recente mostrou que no Brasil, a média de positividade para HAstV entre a população infantil hospitalizada é de 3,9%, sendo mais elevada considerando-se as crianças menores de 1 ano (5,3%) (Siqueira et al. 2017). Outros estudos mostram índices de positividade que variam entre 4,3% a 28,2% em populações pediátricas (Resque et al. 2007; Santos et al. 2007), entretanto pode ser encontrada uma frequência mais elevada durante os surtos, podendo chegar até 56%, como demonstrado em amostras fecais de população da Reserva Maxakali, Minas Gerais, causado pelo HAstV-2 (Gabbay et al. 2006). Nos estados do Rio de Janeiro e Pará foi detectada positividade de 14% e 14,7%, respectivamente (Victoria et al. 2007; Aragão et al. 2010). Em um estudo realizado com amostras coletadas entre janeiro de 2005 e dezembro de 2011, afim de observar a positividade para HAstV, encontrou-se uma média de 7,1% de positividade em crianças com menos de cinco anos e que apresentavam casos de diarreia aguda, nas regiões Sul (7,9%), Sudeste (9,2%) e Nordeste (3,9%) do país (Xavier et al. 2015). Já em um estudo realizado recentemente entre crianças menores de cinco anos, com e sem caso de gastroenterite aguda mostrou positividade global de 4,7% sendo 6,2% em sintomáticos e 2,4% em assintomáticos (Bitencurt et al. 2019). Todos esses estudos brasileiros foram feitos utilizando a metodologia de RT-PCR e com exceção às amostras de um surto, o sorotipo mais identificado foi o HAstV-1.

Dentre os oito sorotipos circulantes, HAstV 1-8, o sorotipo HAstV-1 é o mais frequente mundialmente, seguido pelos sorotipos 2-5 e 8, enquanto os sorotipos HAstV-6 e 7 são raramente detectados (De Benedictis et al. 2011). Entretanto, ocorrem variações de circulação viral dependendo do tempo e localização, como um estudo realizado na Cidade do México mostrando o sorotipo 2 como o mais frequente na população (Guerrero et al. 1998).

Na região Centro-Oeste, um estudo realizado com amostras fecais de crianças com diarreia aguda nas cidades de Campo Grande, Goiânia e Brasília revelou positividade de 3,5% para HAstV utilizando como método de triagem o RT-PCR. Neste estudo foram detectados os sorotipos HAstV-1, 2, 3, 4, 5 e 6 em Brasília, e os HAstV-1, 2, 4, 7 e 8 foram detectados em Goiânia e em Campo Grande, entre os anos de 1994 e 2003. O HAstV-1 foi o sorotipo mais frequente nas amostras obtidas em Goiânia e em Campo Grande e o HAstV-2 na cidade de Brasília (Silva et al. 2009).

Em relação aos HAstV não clássicos, um estudo realizado por Finkbeiner (2009), foi o primeiro a identificar MLB1, analisando 254 amostras fecais, obtidas entre maio e junho de 2008, por RT-PCR, em um grupo de crianças com quadros de diarreia, que foram admitidas no St. Louis Children's Hospital na cidade de St. Louis, Missouri, sugerindo que o vírus tenha saído da Austrália e se disseminado pelo mundo. Algum tempo depois, o MLB3 foi detectado na Índia em cerca de 0,6% das amostras fecais analisadas (Jiang et al. 2013). Um estudo realizado no Gâmbia e Quênia em uma população de crianças com idade entre 0 e 59 meses, apresentando diarreia moderada ou grave e controles pareados, mostrou a ocorrência de HAstV clássicos e não clássicos com positividade total de 9,9%, para HAstV clássicos, MLBs e VAs. A espécie MLB3 foi a mais frequente (2,6%) seguida de HAstV (2,5%) e MLB1 (1,7%), já as espécies VA1 e VA2 foram detectadas em uma baixa porcentagem, sendo mais detectados nas amostras controle do que nos casos, em ambos os países (Meyer et al. 2015).

No Brasil, ao nosso conhecimento, existe apenas um estudo sobre astrovírus não clássicos. Neste estudo, 200 amostras de indivíduos provenientes de três regiões costeiras do país (Nordeste, Sudeste e Sul) foram analisadas por RT-PCR, sendo o vírus MLB1 detectado em duas amostras de crianças com gastroenterite. Sugerindo a circulação do vírus em dois estados brasileiros, Maranhão e Rio de Janeiro, e revelando que as novas espécies de astrovírus já circulam no país (Xavier et al. 2015).

1.8. Prevenção e Controle

A medida mais eficiente para a prevenção da infecção por HAstV é a boa higienização das mãos com água e sabão, especialmente após o uso do banheiro e antes de comer ou preparar alimentos (Vu et al. 2016), principalmente em locais de alto risco, como hospitais, asilo, creches e restaurantes, onde é mais comum ocorrer o contato pessoa-pessoa ou a contaminação de alimentos. A desinfecção de fômites também é altamente recomendado. O uso de álcool a 90%, mostra-se eficiente na desinfecção de fômites e das mãos (Kurtz et al. 1980). A detecção e inativação do vírus em água e alimentos representa a melhor opção para a prevenção de surtos relacionados à água e alimentos. Os HAstV mostram uma sobrevivência prolongada em água, mas o uso da concentração de 1 mg/litro de cloro por cerca de duas horas mostra uma boa taxa de inativação do vírus (Abad et al. 1997).

A gastroenterite causada por HAstV é geralmente moderada e autolimitado podendo afetar a rotina das pessoas infectadas por alguns dias, entretanto não é necessária uma terapia específica. Os cuidados indicados para os pacientes acometidas pelo HAstV são os mesmos aplicados em quadros de gastroenterites, de uma forma geral. Em casos onde ocorre a desidratação o tratamento é realizado por rehidratação oral (Méndez & Arias 2013).

Até o momento, não foram licenciadas vacinas contra os AstVs. A falta de interesse pode ser reflexo do conhecimento de dados epidemiológicos que mostram a infecção por HAstV ser geralmente autolimitada, sendo raros os casos fatais. Um fator importante a ser considerado para o desenvolvimento de uma vacina eficaz seria que a vacina devesse fornecer uma cobertura abrangente contra todos os tipos virais circulantes, ou ao menos os mais frequentes. Recentemente foi reportado o desenvolvimento de uma vacina trivalente de subunidade, pela fusão dos domínios P dos três vírus: AstV, Norovírus e o vírus da Hepatite E (Xia et al. 2016).

2. JUSTIFICATIVA

A gastroenterite aguda (GEA) constitui importante problema de saúde mundial, sendo uma das principais causas registradas de morbidade infantil, em crianças de até cinco anos de idade, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos (Liu et al. 2012). Enquanto o número de infecções por bactérias e parasitas tende a diminuir, após uma maior distribuição de água tratada e políticas de saneamento básico, os índices para os casos de gastroenterite associados aos vírus ainda permanecem elevados, sendo vários os agentes associados a esse quadro. Além disso, de tempos em tempos, novos vírus gastroentéricos são descobertos e passam a ser associados a quadros de gastroenterite (Oude Munnink et al. 2016). Ademais, após o licenciamento e implementação das vacinas contra os rotavírus em diferentes países do mundo, outros agentes gastroentéricos como os astrovírus, adenovírus e calicivírus tem assumido papel de destaque na etiologia das gastroenterites virais (Bucardo et al. 2014; Yu et al. 2018), e, dependendo da população analisada, os HAstV podem ser os mais detectados, superando os índices de rotavírus e norovírus (Arowolo et al. 2019).

Os astrovírus têm uma ampla gama de hospedeiros de diferentes espécies. E, recentemente, novas espécies do grupo HAstV-MLB e HAstV-VA/HMO, que infectam humanos, mas que tem a maior similaridade genômica com vírus que infectam animais, foram descobertas (Kapoor et al. 2009; Finkbeiner et al. 2009a). Tais agentes além de serem associados à gastroenterite, tem também sido associados a outros quadros clínicos (Holtz et al. 2011b, 2011a; Cordey et al. 2016b). Tais fatos sugerem a ocorrência de recombinação genômica entre diferentes tipos de astrovírus, bem como do potencial de emergência de novas variantes de HAstV na população humana (Vu et al. 2017).

Apesar do aumento de estudos acerca dos HAstV clássicos, dados sobre HAstV não clássicos são ainda escassos. Ao nosso conhecimento, não existem ainda estudos sobre os HAstV não clássicos em populações de outros países da América do Sul e, no Brasil, existe apenas um estudo que pesquisou os HAstV não clássicos na região litorânea do país (Xavier et al. 2015). Portanto, dados sobre a frequência e a distribuição geográfica dos genótipos desse vírus pelo país, bem como suas associações com sintomatologia apresentada pelos indivíduos infectados são limitados.

Com o passar dos anos dados da literatura demonstram o surgimento de novas espécies de astrovírus (HAstV não clássicos) que infectam humanos, bem como sua associação a quadros mais graves, os quais sugerem a disseminação desses vírus para outros locais do organismo. Dessa forma, é notória a lacuna no conhecimento em relação a epidemiologia molecular desses agentes virais no Brasil, fato que suporta a realização do presente estudo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- 3.1.1. Pesquisar astrovírus humanos não clássicos em uma população de crianças com ou sem sintomas de gastroenterite, atendidas em um hospital de referência para o atendimento infantil em Goiânia, Goiás.

3.2. Objetivos Específicos

- 3.2.1. Determinar a positividade para astrovírus humanos não clássicos (HAstV-MLB) em amostras de fezes das crianças participantes do estudo;
- 3.2.2. Realizar a caracterização molecular das amostras positivas para HAstV-MLB;
- 3.2.3. Associar os sintomas apresentados pelos participantes do estudo com a positividade para HAstV-MLB.

4. METODOLOGIA

1.1. Local de estudo

O Hospital Materno Infantil (HMI) é um hospital público de referência no atendimento pediátrico em Goiás. Além do atendimento ambulatorial e de emergência oferece atendimento nas especialidades de pediatria, ginecologia e obstetrícia, sendo sua atenção voltada para crianças e mulheres.

1.2. Coleta de amostras

Este é um estudo observacional descritivo, de corte transversal para a pesquisa de astrovírus humanos não clássicos em amostras de fezes, obtidas por conveniência entre maio de 2014 a abril de 2015, de crianças com ou sem sintomas de gastroenterite aguda, atendidas no HMI, com até seis anos de idade. As amostras fecais foram coletadas semanalmente, sendo obtida uma amostra de cada criança participante do estudo.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (CAAE 19948113.6.0000.5078) (Anexo 1). O trabalho faz parte do monitoramento contínuo das gastroenterites virais na região Centro-Oeste, em diferentes populações, que vem sendo realizado desde a década de 1980 pelo Laboratório de Virologia Humana e Cultivo Celular/IPTSP/UFG.

Para a inclusão das crianças, procedeu-se uma abordagem direta dos possíveis casos elegíveis. Os prontuários/fichas de avaliação clínica das crianças selecionadas foram avaliados pela médica da equipe de pesquisa, e, para a definição de quadro sintomático, foram considerados os seguintes critérios: apresentação de sintomas gastroentéricos (vômito e/ou diarreia com ou sem dores abdominais, com ou sem febre), já o quadro assintomático foi constituído por crianças que apresentavam outros sintomas, sendo atendidas no hospital por outros motivos, como: outras doenças infecciosas, procedimentos cirúrgicos, doenças congênitas, entre outros.

Após identificação dos casos elegíveis, realizou-se o recrutamento dos pacientes e esclarecimentos a respeito dos objetivos da pesquisa e metodologia de coleta de amostra. Em caso de consentimento foi obtida a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1) pelos pais ou responsáveis, e realizada

entrevista para preenchimento do questionário contendo dados sociodemográficos (Apêndice 2).

As amostras de fezes foram coletadas em frascos coletores estéreis e armazenadas a 4°C até serem transportadas para o laboratório de virologia/IPTSP/UFG, onde foram processadas a fim de se obter uma suspensão fecal de 20% em tampão salina fosfato (PBS, pH 7,4). As amostras foram aliquotadas e estocadas a -80°C, até a realização dos ensaios laboratoriais.

1.3. Extração do RNA viral

A extração de RNA viral foi realizada por meio do kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen - Hilden, Alemanha), a partir das suspensões fecais, seguindo instruções do fabricante. Inicialmente, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por dez minutos com tampão AVL de lise fornecidos pelo kit. Em seguida, 560 µL de etanol foram adicionados às amostras, as quais foram aplicadas em colunas, e o produto lisado foi descartado por centrifugação. A próxima etapa consistiu de sucessivas etapas de lavagem utilizando 500 µL dos tampões AW1 e AW2 também fornecidos pelo kit. Na última etapa, foram utilizados 60 µL do tampão AVE, para eluir as amostras, sendo separados 20 µL de cada amostra para serem utilizadas na síntese do cDNA.

1.4. Síntese de cDNA

Aos 20 µL do RNA viral foi adicionado o iniciador randômico (pd (N)6 (100 ng/µL) (Random Hexamer – Amersham Biosciences) e realizada a desnaturação em termociclador (Mastercycler Personal, Eppendorf) a 80°C/15min e 4°C/5min. Em seguida, o produto foi adicionado a mistura do cDNA (H₂O DEPC q.s.p/ Tampão de reação a 1 x/ 0,4 mM de cada dNTP/ 4 mM de MgCl₂/ 1 mM de DTT/ inibidor de RNAs 20 U/µL e Transcriptase Reversa - MMLV 200 U/µL), com um volume final de 50 µL. Os reagentes foram incubados no termociclador por 37°C por 60 minutos. O cDNA foi estocado à -20°C, até o momento do uso.

1.5. Ensaios de RT-PCR e Semi-Nested PCR

Para a pesquisa de HAstV-Melbourne (MLB), foi utilizada a metodologia de RT-PCR seguida de Semi-Nested PCR, segundo a descrição de Hata et al. (2015), sendo

incluídas degenerações nos iniciadores a fim de que fossem sensíveis para a detecção de todos os MLBs (1-3).

Brevemente, na primeira etapa da RT-PCR foi realizada uma reação com um volume final de 25 μ L contendo 5 μ L de cDNA adicionado a uma mistura de reação contendo 1x de GoTaq Colorless Master Mix (Promega – EUA), água livre de nucleases q.s.p, $MgCl_2$ a concentração de 3,5 mM e 0,4 μ M dos iniciadores *sense* e *antisense* SF0073 e AHMLBR1, que tem como alvo a região 3' final da ORF1b (Tabela 1).

Tabela 1 – Iniciadores utilizados nos ensaios de RT-PCR e Semi-Nested PCR, descritos por Hata (2015), com modificações.

<i>Ensaio</i>	<i>Iniciador</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>Sentido</i>	<i>Localização (nt)</i>
<i>RT-PCR e Semi-Nested</i>	SF0073	GAYTGGACHMGATTTGATGG	Sense	3110 – 3129
<i>RT-PCR</i>	AHMLBR1	CAGGYTTAGGCCAGTTGTA	Antisense	4016 – 4035
<i>Semi-Nested</i>	AHMLBR2	GAGTGAAGCGCCTTGGYAAG	Antisense	3779 – 3798

Os tubos de PCR foram colocados no termociclador (Mastercycler Personal - Eppendorf) e a seguinte ciclagem programada:

Desnaturação inicial:	94°C – 5 min	} 40 ciclos
Desnaturação:	94°C – 30 seg	
Anelamento:	52°C – 45 seg	
Extensão:	72°C – 1 min	
Extensão final:	72°C – 7 min	

Para a segunda reação (Semi-Nested), 1,0 μ L do produto da primeira reação, foi adicionado a uma mistura de reação com as mesmas condições da primeira etapa, contendo 0,4 μ M dos iniciadores *sense* e *antisense* SF0073 e AHMLBR2. Os tubos de PCR foram colocados no termociclador (Mastercycler Personal - Eppendorf) com a seguinte ciclagem programada:

Desnaturação inicial:	94°C – 5 min	
Desnaturação:	94°C – 15 seg	} 30 ciclos
Anelamento:	52°C – 30 seg	
Extensão:	72°C – 45 seg	
Extensão final:	72°C – 7 min	

Os produtos da Semi-Nested PCR, juntamente com amostras, controle negativo (água MilliQ), controle positivo (MLB1 (GenBank: KC294576.1), gentilmente doado pela Dra. Marize Pereira Miagostovich do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental da FIOCRUZ) e padrão de peso molecular 100 pares de bases (pb), foram submetidos a corrida eletroforética em tampão (Type III 6x), em gel de agarose a 1,5% e tampão Tris Borato EDTA (TBE 0,5 x). Sendo esperados fragmentos de 689 pb para os MLBs.

1.6. Sequenciamento molecular

Após as amostras serem amplificadas, os *amplicons* foram submetidos à purificação com isopropanol e etanol nas concentrações de 65% e 70%, respectivamente. Brevemente, a purificação consistiu de três passos. O primeiro foi a precipitação, quando foi adicionado 2X o volume da amostra de isopropanol 65% seguido de centrifugação (13000 rpm a 10°C por 10 minutos) e descarte do sobrenadante. O segundo foi a lavagem, onde adicionou-se 2X o volume da amostra de etanol 70% seguindo novamente de centrifugação (13000 rpm a 10°C por 5 minutos), sendo descartado o sobrenadante. O terceiro foi a secagem dos tubos, em temperatura ambiente, que foram invertidos sendo aguardada aproximadamente uma hora até a secagem completa do resíduo de etanol do passo anterior. Após a secagem o produto purificado foi eluído em 16 µL de água DEPC a concentração de 0,1% (Sambrook 1989).

A amostra positiva por Semi-Nested PCR, foi submetida em duplicata à reação de sequenciamento genômico utilizando o kit comercial BigDye Terminator versão 3.01 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com os iniciadores *sense* e *antisense* (SF0073 e AHMLBR2) utilizados na reação de Semi-Nested PCR, em duplicata. Em seguida a amostra foi levada ao termociclador utilizando a ciclagem: 25 ciclos de 90°C por 20 segundos, 58°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

Posteriormente, a amostra foi precipitada com isopropanol a 65% e etanol 60%, e após centrifugação o etanol foi retirado da placa e colocada novamente no termociclador para a secagem completa (2 minutos a 95°C) e por fim, foi adicionado a formamida. A reação de sequenciamento foi realizada em sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), para obtenção das sequencias e leituras dos eletroferogramas.

1.7. Análise das sequências

A qualidade das sequencias obtidas foi analisada por meio do algoritmo phred/phrap (Ewing et al. 1998) utilizando a ferramenta disponível no site Electropherogram quality analysis (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), o qual também foi utilizado para a montagem de uma sequência consenso. Em seguida foi realizado o BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) da sequência obtida, a qual foi alinhada com as sequencias dos vírus MLBs que possuíam maior identidade nucleotídica obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com o programa Clustal X (Thompson et al. 1997). Para a edição das sequências foi utilizado o programa BioEdit. Para a construção da árvore filogenética foram utilizados protótipos de astrovírus humanos não clássicos (HAstV-MLB1-3) obtidas no GenBank e utilizando o programa MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar et al. 2018). As análises foram realizadas através do método Neighbor-Joining, modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros, considerando 1500 replicatas e valores *bootstraps* acima de 80%.

5. RESULTADOS

Foram incluídas nesse estudo 250 crianças, sendo obtida uma amostra fecal de cada um dos participantes, entre o período de maio de 2014 e abril de 2015. A população foi constituída de 55,6% (139/250) de pacientes do sexo masculino e 44,4% (111/250) do sexo feminino, com idades variando entre 0 e 70 meses. Os pacientes com sintomas gastroentéricos representaram 43,2% (108/250) da população enquanto os assintomáticos para gastroenterite 56,8% (142/250).

Tabela 2 – Características gerais da população de estudo

	<i>Características</i>	<i>N</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
<i>Sexo</i>	Feminino	111	44,4
	Masculino	139	55,6
<i>Idade (meses)</i>	0-24	205	82,0
	25-48	31	12,4
	49-70	14	5,6
<i>Presença de sintomas</i>	Sim	108	43,2
	Não	142	56,8
<i>Sintomas GEA</i>	Diarreia e vômito	37	34,3
	Diarreia sem vômito	61	56,5
	Vômito sem diarreia	0	0,0
	Sem dados sobre sintomas	10	9,2

Todas as 250 amostras de fezes foram testadas pela técnica de RT-PCR seguido de Semi-Nested PCR, sendo encontrada uma amostra positiva, o que representa uma positividade de 0,4% (1/250) para o vírus HAsV-MLB1.

A amostra positiva pertencia à paciente L.R.S do sexo feminino, de 12 meses de idade na data da coleta da amostra. A paciente foi atendida no pronto socorro do hospital com sintomas de GEA, diarreia com uma frequência >2x/dia, de aspecto semi-líquido, sem vômito e sem dor abdominal, e com sintomas respiratórios (tosse), além de febre. O cartão de vacinação estava atualizado, e a criança havia recebido vacinas contra influenza e contra rotavírus (esquema completo). A mesma foi diagnosticada como tendo diarreia e infecção das vias aéreas superiores.

A amostra positiva pela técnica de Semi-Nested PCR foi então submetida ao sequenciamento a fim de caracterizar o tipo de HAsV-MLB, sendo classificada como HAsV-MLB1.

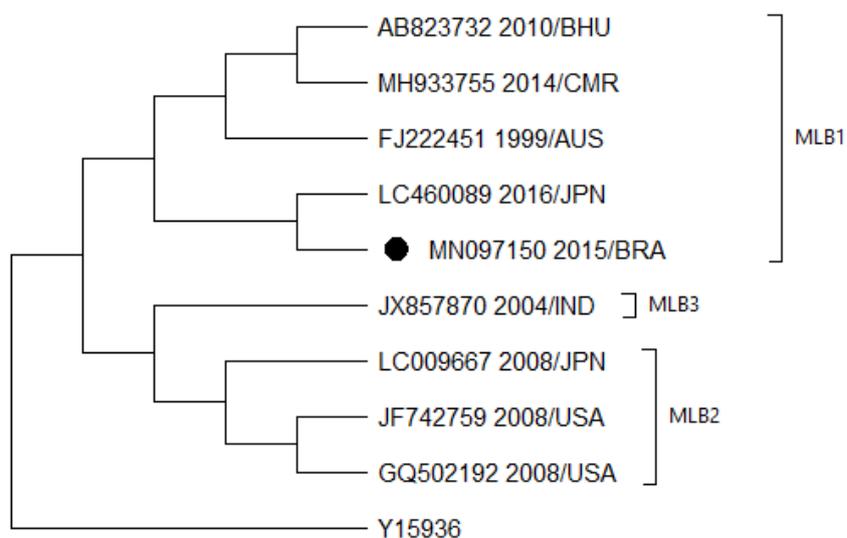


Figura 6 – Árvore filogenética da sequência parcial (689 pb) da RNA polimerase RNA dependente do HAsV-MLB1 detectado em amostra fecal proveniente de uma criança com sintoma de gastroenterite. As amostras protótipo são representadas pelo número de acesso do GenBank. A amostra encontrada nesse estudo (MN097150) está representada por um círculo cheio (●). A amostra Y15936 (Avastrovirus 1) foi utilizada como *outgroup*.

6. DISCUSSÃO

Até o momento, nenhum estudo descreveu a circulação dos HAstV não clássicos no Centro-Oeste sendo este o primeiro estudo a realizar a pesquisa desse agente na região. O presente estudo faz parte de um projeto maior que objetivou a pesquisa e caracterização de diversos vírus gastroentéricos nessa mesma população, sendo detectadas elevados índices de positividade para norovírus (18,8%) (Dábilla et al. 2017) e sapovírus (18,6%) (Neres Silva et al. 2017) e a diminuição da frequência de rotavírus (16,4%) (Almeida et al. 2015), quando comparada a estudos anteriores em população semelhante.

Estudos realizados em diferentes partes do mundo têm reportado a circulação dos diferentes sorotipos de astrovírus clássicos (HAstV1-8) (Chhabra et al. 2013; Dai et al. 2010; Ouédraogo et al. 2016; Resque et al. 2007). A ocorrência de astrovírus não clássicos (MLBs e VAs) têm também sido reportada em vários países, sendo os índices de positividade mais baixos do que os HAstV clássicos (Vu et al. 2016).

Neste estudo foi observado uma positividade de 0,4% (1/250), por Semi-Nested PCR para astrovírus não clássico MLB1. Como referido, a positividade para HAstV não clássicos é geralmente baixa, em média 1,5%, podendo variar de 0,2% a 10,6% em pacientes com GEA (Vu et al. 2017), sendo semelhante aos dados obtidos. Apesar da co-infecção por vírus gastroentéricos não ser incomum a amostra positiva identificada neste estudo não foi positiva para nenhum dos outros vírus pesquisados.

Nos Estados Unidos, foi realizado um estudo utilizando a técnica de RT-PCR em amostras de crianças menores de cinco anos de idade com quadro de GEA, sendo identificado uma positividade de 0,6% para MLB1 (Finkbeiner 2009). Na China, também utilizando amostras de crianças menores de 5 anos com GEA, os autores encontraram frequência de 1,2% para HAstV-MLB1 e MLB2 (Wang et al. 2013). Estudos conduzidos em países africanos entre crianças com e sem GEA mostraram o MLB1, no Quênia, associado a 6,1% dos casos e 0,6% dos controles, e no Gâmbia em 0,8% dos casos e 0,6% dos controles (Meyer et al. 2015), enquanto no Japão foi reportado uma positividade de 10,6% para HAstV não clássicos entre crianças com GEA, sendo o MLB1 o vírus mais prevalente (59,2%) em relação aos HAstV clássicos e HAstV-VA (Khamrin et al. 2016).

Um estudo realizado no Brasil, foi o primeiro a identificar a circulação do HAstV-MLB1 no país, por meio da técnica de RT-PCR, com uma positividade de 1% em amostras nos estados do Maranhão e Rio de Janeiro em crianças menores de 5 anos, com quadro de GEA demonstrando a circulação do vírus nas regiões Nordeste e Sudeste do país (Xavier et al. 2015).

Neste estudo, a única amostra positiva para MLB foi obtida de uma criança de um ano de idade que apresentava diarreia, sintomas respiratórios e febre. Apesar da identificação dos HAstV-MLB e HAstV-VA ser principalmente associada a casos de GEA, Holtz e colaboradores (2011a) demonstraram uma maior positividade para o MLB1 entre os pacientes assintomáticos enquanto Meyer e colaboradores (2015) mostraram uma maior positividade para MLB2, MLB3, VA1 e VA3 em pacientes controle (sem GEA), demonstrando que os HAstV não clássicos podem ser encontrados em indivíduos com ou sem sintomas.

A amostra positiva para MLB foi caracterizada como MLB1, por sequenciamento e análise filogenética, ratificando a circulação do mesmo em outros estados do país. Não foi possível realizar uma análise de identidade nucleotídica entre a amostra e as outras já sequenciadas no Brasil, em razão da região sequenciada não ser a mesma. A análise de matriz de identidade entre a amostra sequenciada desse trabalho e sequências semelhantes depositadas no GenBank demonstrou elevada identidade nucleotídica entre a amostra sequenciada nesse estudo e as sequências do banco de dados, sendo a maior identidade (97%) (LC460089 2016/JPN) observada entre uma amostra isolada do esgoto no Japão no ano de 2016, sugerindo que o mesmo vírus estava circulando em diferentes partes do mundo no mesmo período.

Apesar dos estudos publicados em relação ao MLB e VA, o diagnóstico da infecção por esses vírus não é feito na rotina laboratorial, ficando o mesmo restrito aos centros de pesquisas, com foco principalmente em populações hospitalizadas ou em amostras provenientes de surtos de GEA (Svraka et al. 2007; Lyman et al. 2009; Verma et al. 2010b; Medici et al. 2012; Chhabra et al. 2013; van der Doef et al. 2016). Tal fato contribui para que a ocorrência desses vírus não seja analisada em outros ambientes e em diversos tipos de população.

Em razão do ineditismo desse estudo, acreditamos que os dados vêm a contribuir para a epidemiologia molecular dos astrovírus não clássicos na população pediátrica. Mais estudos, com um maior número de amostras deverão ser conduzidos a fim de melhor avaliar a epidemiologia desses agentes na região, bem como o seu perfil molecular.

7. CONCLUSÕES

Nesse estudo foi observada baixa positividade (0,4%) para astrovírus não clássicos, semelhante aos índices de positividade reportados em outras regiões do mundo em população pediátrica com ou sem sintomas de gastroenterite aguda.

A amostra positiva foi caracterizada como astrovírus não clássico MLB1, sendo este o primeiro trabalho a identificar a circulação desse vírus na região Centro-Oeste do Brasil.

A criança positiva para MLB1 apresentou diarreia, além de tosse e febre. Sintomas que têm sido reportados em associação aos astrovírus não clássicos em diferentes populações pediátricas.

REFERÊNCIAS

- Abad, F.X., Pintó, R.M., Villena, C., Gajardo, R. & Bosch, A. Astrovirus survival in drinking water. *Applied and environmental microbiology* 63: 3119–22, 1997.
- Abad, F.X., Villena, C., Guix, S., Caballero, S., Pintó, R.M. & Bosch, A. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Applied and environmental microbiology* 67: 3904–7, 2001.
- Almeida, T.N.V., Fiaccadori, F.S., Souza, M., Borges, A.M.T. & Cardoso, D. das D. de P. Molecular characterization of group A rotavirus before and after the introduction of vaccines in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48: 599–602, 2015.
- Aragão, G.C., Oliveira, D. de S., Santos, M.C. dos., Mascarenhas, J.D.P., Oliveira, C.S. de., Linhares, A. da C., et al. Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 1: 2010.
- Arowolo, K., Ayolabi, C., Lapinski, B., Santos, J. & Raboni, S. Epidemiology of enteric viruses in children with gastroenteritis in Ogun State, Nigeria. *Journal of Medical Virology* 91: 1022–1029, 2019.
- Bagci, S., Eis-Hübinger, A.M., Franz, A.R., Bierbaum, G., Heep, A., Schildgen, O., et al. Detection of astrovirus in premature infants with necrotizing enterocolitis. *The Pediatric infectious disease journal* 27: 347–50, 2008.
- Bass, D.M. & Qiu, S. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *Journal of virology* 74: 1810–4, 2000.
- Belliot, G., Laveran, H. & Monroe, S.S. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *Journal of medical virology* 51: 101–6, 1997.
- Bitencurt, E., Siqueira, J., Medeiros, T., Bandeira, R., de Souza Oliveira, D., de Paula Souza E Guimarães, R., et al. Epidemiological and molecular investigation of norovirus and astrovirus infections in Rio Branco, Acre, Northern Brazil: A retrospective study. *Journal of Medical Virology* 91: 997–1007, 2019.

- Bosch, A. *Human Viruses in Water*. Amsterdam: Elsevier Science 2007.
- Bosch, A., Guix, S., Krishna, N.K., Méndez, E., Monroe, S.S., Pantin-Jackwood, M., et al. Family - Astroviridae. In King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., et al. (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 953–959). San Diego, CA: Elsevier 2012.
- Bosch, A., Pintó, R.M. & Guix, S. Human astroviruses. *Clinical Microbiology Reviews* 27: 1048–1074, 2014.
- Brassard, J., Gagné, M.-J., Généreux, M. & Côté, C. Detection of Human Food-Borne and Zoonotic Viruses on Irrigated, Field-Grown Strawberries. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 3763–3766, 2012.
- Brinker, J.P., Blacklow, N.R. & Herrmann, J.E. Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines. *Archives of Virology* 145: 1847–1856, 2000.
- Brown, D.W., Gunning, K.B., Henry, D.M., Awdeh, Z.L., Brinker, J.P., Tzipori, S., et al. A DNA oligonucleotide microarray for detecting human astrovirus serotypes. *Journal of virological methods* 147: 86–92, 2008.
- Brown, J.R., Morfopoulou, S., Hubb, J., Emmett, W.A., Ip, W., Shah, D., et al. Astrovirus VA1/HMO-C: An Increasingly Recognized Neurotropic Pathogen in Immunocompromised Patients. *Clinical Infectious Diseases* 60: 881–888, 2015.
- Bucardo, F., Reyes, Y., Svensson, L. & Nordgren, J. Predominance of Norovirus and Sapovirus in Nicaragua after Implementation of Universal Rotavirus Vaccination. *PLoS ONE* 9: e98201, 2014.
- Caballero, S., Guix, S., El-Senousy, W.M., Calicó, I., Pintó, R.M. & Bosch, A. Persistent gastroenteritis in children infected with astrovirus: Association with serotype-3 strains. *Journal of Medical Virology* 71: 245–250, 2003.
- Chhabra, P., Payne, D.C., Szilagyi, P.G., Edwards, K.M., Staat, M.A., Shirley, S.H., et al. Etiology of Viral Gastroenteritis in Children <5 Years of Age in the United States, 2008–2009. *The Journal of Infectious Diseases* 208: 790–800, 2013.
- Cordey, S., Brito, F., Vu, D.-L., Turin, L., Kilowoko, M., Kyungu, E., et al. Astrovirus VA1 identified by next-generation sequencing in a nasopharyngeal specimen of a

febrile Tanzanian child with acute respiratory disease of unknown etiology. *Emerging microbes & infections* 5: e67, 2016a.

Cordey, S., Vu, D., Schibler, M., Huillier, A.G.L., Brito, F., Docquier, M., et al. Astrovirus MLB2, a New Gastroenteric Virus Associated with Meningitis and Disseminated Infection. 22: 2016b.

Cortez, V., Meliopoulos, V.A., Karlsson, E.A., Hargest, V., Johnson, C. & Schultz-cherry, S. Astrovirus Biology and Pathogenesis. 2017.

Cox, G.J., Matsui, S.M., Lo, R.S., Hinds, M., Bowden, R.A., Hackman, R.C., et al. Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. *Gastroenterology* 107: 1398–407, 1994.

Dábilla, N., Nunes Vieira Almeida, T., Carvalho Rebouças Oliveira, A., Kipnis, A., Neres Silva, T., Souza Fiaccadori, F., et al. Norovirus in feces and nasopharyngeal swab of children with and without acute gastroenteritis symptoms: First report of GI.5 in Brazil and GI.3 in nasopharyngeal swab. *Journal of Clinical Virology* 87: 60–66, 2017.

Dai, Y., Xu, Q., Wu, X., Hu, G., Tang, Y., Li, J., et al. Development of real-time and nested RT-PCR to detect astrovirus and one-year survey of astrovirus in Jiangmen City, China. *Archives of Virology* 155: 977–982, 2010.

De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A. & Cattoli, G. Astrovirus infections in humans and animals – Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 1529–1544, 2011.

Donelli, G., Superti, F., Tinari, A. & Marziano, M.L. Mechanism of Astrovirus Entry Into Graham 293 Cells. 277: 271–277, 1992.

Espul, C., Martínez, N., Noel, J.S., Cuello, H., Abrile, C., Grucci, S., et al. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *Journal of medical virology* 72: 75–82, 2004.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. & Green, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome research* 8: 175–85, 1998.

Finkbeiner, S.R. Detection of Newly Described Astrovirus MLB1 in Stool Samples from Children. *Emerging Infectious Diseases* 15: 441–444, 2009.

- Finkbeiner, S.R., Holtz, L.R., Jiang, Y., Rajendran, P., Franz, C.J., Zhao, G., et al. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Virology Journal* 6: 161, 2009a.
- Finkbeiner, S.R., Kirkwood, C.D. & Wang, D. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *Virology Journal* 5: 117, 2008.
- Finkbeiner, S.R., Li, Y., Ruone, S., Conrardy, C., Gregoricus, N., Toney, D., et al. Identification of a Novel Astrovirus (Astrovirus VA1) Associated with an Outbreak of Acute Gastroenteritis. *Journal of Virology* 83: 10836–10839, 2009b.
- Firth, A.E. & Atkins, J.F. Candidates in astroviruses, seadornaviruses, cytorhabdoviruses and coronaviruses for +1 frame overlapping genes accessed by leaky scanning. *Virology Journal* 7: 1–11, 2010.
- Fodha, I., Chouikha, A., Peenze, I., De Beer, M., Dewar, J., Geyer, A., et al. Identification of viral agents causing diarrhea among children in the Eastern Center of Tunisia. *Journal of Medical Virology* 78: 1198–1203, 2006.
- Frémond, M., Pérot, P., Muth, E., Cros, G., Dumarest, M., Mahlaoui, N., et al. Next-Generation Sequencing for Diagnosis and Tailored Therapy : A Case Report of Astrovirus- Associated Progressive Encephalitis. 1–5, 2015.
- Fuentes, C., Bosch, A., Pinto, R.M. & Guix, S. Identification of Human Astrovirus Genome-Linked Protein (VPg) Essential for Virus Infectivity. *Journal of Virology* 86: 10070–10078, 2012. <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00797-12>.
- Gabbay, Y.B., Chamone, C.B., Nakamura, L.S., Oliveira, D.S., Abreu, S.F. de., Cavalcante-Pepino, E.L., et al. Characterization of an astrovirus genotype 2 strain causing an extensive outbreak of gastroenteritis among Maxakali Indians, Southeast Brazil. *Journal of Clinical Virology* 37: 287–292, 2006.
- Gabbay, Y.B., Linhares, A.C., Cavalcante-Pepino, E.L., Nakamura, L.S., Oliveira, D.S., da Silva, L.D., et al. Prevalence of human astrovirus genotypes associated with acute gastroenteritis among children in Belém, Brazil. *Journal of medical virology* 79: 530–8, 2007.
- Gallimore, C.I., Taylor, C., Gennery, A.R., Cant, A.J., Galloway, A., Lewis, D., et al.

Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. *Journal of clinical microbiology* 43: 3890–4, 2005.

Gonzales-Gustavson, E., Timoneda, N., Fernandez-Cassi, X., Caballero, A., Abril, J.F., Buti, M., et al. Identification of sapovirus GV.2, astrovirus VA3 and novel anelloviruses in serum from patients with acute hepatitis of unknown aetiology. *PLoS ONE* 12: 1–17, 2017.

Grohmann, G.S., Glass, R.I., Pereira, H.G., Monroe, S.S., Hightower, A.W., Weber, R., et al. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. Enteric Opportunistic Infections Working Group. *The New England journal of medicine* 329: 14–20, 1993.

Guerrero, M.L., Noel, J.S., Mitchell, D.K., Calva, J.J., Morrow, A.L., Martínez, J., et al. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *The Pediatric infectious disease journal* 17: 723–7, 1998.

Guix, S., Caballero, S., Villena, C., Bartolome, R., Latorre, C., Rabella, N., et al. Molecular Epidemiology of Astrovirus Infection in. *40*: 133–139, 2002.

Guyader, S. Le., Saux, J. Le., Ambert-balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., et al. Aichi Virus , Norovirus , Astrovirus , Enterovirus , and Rotavirus Involved in Clinical Cases from a French Oyster-Related Gastroenteritis Outbreak □ *Franc.* 46: 4011–4017, 2008.

Hall, A.J., Wikswa, M.E., Manikonda, K., Roberts, V.A., Yoder, J.S. & Gould, L.H. Acute Gastroenteritis Surveillance through the National Outbreak Reporting System, United States. *Emerging Infectious Diseases* 19: 1305–1309, 2013.

Hata, A., Katayama, H., Kitajima, M. & Furumai, H. Wastewater analysis indicates that genetically diverse astroviruses, including strains belonging to novel clades MLB and VA, are circulating within Japanese populations. *Applied and Environmental Microbiology* 81: 4932–4939, 2015.

Holtz, L.R., Bauer, I.K., Rajendran, P., Kang, G. & Wang, D. Astrovirus MLB1 is not associated with diarrhea in a cohort of Indian children. *PLoS ONE* 6: 1–3, 2011a.

Holtz, L.R., Wylie, K.M., Sodergren, E., Jiang, Y., Franz, C.J., Weinstock, G.M., et al. Astrovirus MLB2 Viremia in Febrile Child. *17*: 2–4, 2011b.

ICTV. Virus Taxonomy. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy: 2018b Release* 2018.

Jarchow-macdonald, A.A., Halley, S., Chandler, D., Gunson, R., Shepherd, S.J. & Parcell, B.J. First report of an astrovirus type 5 gastroenteritis outbreak in a residential elderly care home identified by sequencing. *Journal of Clinical Virology Elsevier B.V.* 73: 115–119, 2015.

Jeong, H.S. & Jeong, A. Epidemiology of astrovirus infection in children. *55*: 77–82, 2012.

Jiang, B., Monroe, S.S., Koonin, E. V., Stine, S.E. & Glass, R.I. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 10539–10543, 1993.

Jiang, H., Holtz, L.R., Bauer, I., Franz, C.J., Zhao, G., Bodhidatta, L., et al. Comparison of novel MLB-clade, VA-clade and classic human astroviruses highlights constrained evolution of the classic human astrovirus nonstructural genes. *Virology* 436: 8–14, 2013.

Johnson, C., Hargest, V., Cortez, V., Meliopoulos, V.A. & Schultz-cherry, S. Astrovirus Pathogenesis. 1–10, 2017.

Jonassen, C.M., Jonassen, T. & Grinde, B. A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhinovirus. *Journal of General Virology* 79: 715–718, 1998.

Kapoor, A., Li, L., Victoria, J., Oderinde, B., Mason, C., Pandey, P., et al. Multiple novel astrovirus species in human stool Printed in Great Britain. 2965–2972, 2009.

Khamrin, P., Dey, S.K., Chan-it, W., Thongprachum, A., Satou, K., Okitsu, S., et al. Evaluation of a rapid immunochromatography strip test for detection of astrovirus in stool specimens. *Journal of tropical pediatrics* 56: 129–31, 2010.

Khamrin, P., Thongprachum, A., Okitsu, S., Hayakawa, S., Maneekarn, N. & Ushijima, H. Multiple astrovirus MLB1, MLB2, VA2 clades, and classic human astrovirus in children with acute gastroenteritis in Japan. *Journal of medical virology* 88: 356–60, 2016.

Kim, J., Lee, W., Lee, S., Lee, E., Hyun, J., Kim, H., et al. Molecular Epidemiology of Human Astrovirus in Stool Samples From Patients With Acute Gastroenteritis in Korea, 2013-2017. *Ann Lab Med* 39: 367–372, 2019.

Kim, J.M., Kim, S.Y., Park, Y. Bin., Kim, H.J., Min, B.S., Cho, J.C., et al. Simultaneous detection of major enteric viruses using a combimatrix microarray. *Journal of Microbiology* 50: 970–977, 2012.

Kirkwood, C.D., Clark, R., Bogdanovic-Sakran, N. & Bishop, R.F. A 5-year study of the prevalence and genetic diversity of human caliciviruses associated with sporadic cases of acute gastroenteritis in young children admitted to hospital in Melbourne, Australia (1998-2002). *Journal of Medical Virology* 77: 96–101, 2005.

Koopmans, M. *Foodborne Viruses: Progress and challenges*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press 2008.

Koopmans, M.P., Bijen, M.H., Monroe, S.S. & Vinjé, J. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 5: 33–7, 1998.

Kriston, S., Willcocks, M.M., Carter, M.J. & Cubitt, W.D. Seroprevalence of astrovirus types 1 and 6 in London, determined using recombinant virus antigen. *Epidemiology and Infection* 117: 159–164, 1996.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549, 2018.

Kurtz, J.B. & Lee, T.W. Human astrovirus serotypes. *Lancet (London, England)* 2: 1405, 1984.

Kurtz, J.B., Lee, T.W., Craig, J.W. & Reed, S.E. Astrovirus infection in volunteers. *Journal of medical virology* 3: 221–30, 1979.

Kurtz, J.B., Lee, T.W. & Parsons, A.J. The action of alcohols on rotavirus, astrovirus and enterovirus. *The Journal of hospital infection* 1: 321–5, 1980.

Lee, R.M., Lessler, J., Lee, R.A., Rudolph, K.E., Reich, N.G., Perl, T.M., et al. Incubation periods of viral gastroenteritis: A systematic review. *BMC Infectious*

- Diseases BMC Infectious Diseases 13*: 1, 2013. BMC Infectious Diseases.
- Lee, T.W. & Kurtz, J.B. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. *Journal of General Virology 57*: 421–424, 1981.
- Lee, T.W. & Kurtz, J.B. Human astrovirus serotypes. *The Journal of hygiene 89*: 539–40, 1982.
- Liu, L., Johnson, H.L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J.E., et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet 379*: 2151–2161, 2012.
- Lum, S.H., Turner, A., Guiver, M., Bonney, D., Martland, T., Davies, E., et al. An emerging opportunistic infection: fatal astrovirus (VA1/HMO-C) encephalitis in a pediatric stem cell transplant recipient. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society 18*: 960–964, 2016.
- Madeley, C.R. & Cosgrove, B.P. VIRUSES IN INFANTILE GASTROENTERITIS. *The Lancet 306*: 124, 1975.
- Maldonado, Y., Cantwell, M., Old, M., Hill, D., Sanchez, M.L., Logan, L., et al. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *The Journal of infectious diseases 178*: 334–9, 1998.
- Marczinke, B., Bloys, A.J., Brown, T.D.K., Willcocks, M.M., Carter, M.J. & Brierley, I.A.N. The Human Astrovirus RNA-Dependent RNA Polymerase Coding Region Is Expressed by Ribosomal Frameshifting. *68*: 5588–5595, 1994.
- Marshall, J.A., Bruggink, L.D. & Sturge, K. Molecular features of astrovirus associated with a gastroenteritis outbreak in an aged-care centre. *67–71*, 2007.
- Matsui, M., Ushijima, H., Hachiya, M., Kakizawa, J., Wen, L., Oseto, M., et al. Determination of serotypes of astroviruses by reverse transcription- polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiology and Immunology 42*: 539–547, 1998.
- Matsui, S.M. & Kiang, D. Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural protein. *Journal of General Virology 83*: 25–34, 2002.
- Maunula, L., Kalso, S., Von Bonsdorff, C.H. & Pönkä, A. Wading pool water

contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. *Epidemiology and infection* 132: 737–43, 2004.

Medici, M.C., Tummolo, F., Albonetti, V., Abelli, L.A., Chezzi, C. & Calderaro, A. Molecular detection and epidemiology of astrovirus, bocavirus, and sapovirus in Italian children admitted to hospital with acute gastroenteritis, 2008-2009. *Journal of Medical Virology* 84: 643–650, 2012.

Méndez, E. & Arias, C.F. Astroviruses. In Knipe, D.M. & Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology* (pp. 609–628). Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS 2013.

Mendez, E., Fernandez-Luna, T., Lopez, S., Mendez-Toss, M. & Arias, C.F. Proteolytic Processing of a Serotype 8 Human Astrovirus ORF2 Polyprotein. *Journal of Virology* 76: 7996–8002, 2002.

Méndez, E., Muñoz-yañez, C., Martín, S., Aguirre-crespo, G., Rocio, M., Gutierrez, M., et al. Characterization of Human Astrovirus Cell Entry. 2014.

Méndez, E., Murillo, A., Velázquez, R., Burnham, A. & Arias, C.F. Replication Cycle of Astroviruses. *Astrovirus Research* (pp. 19–45). New York, NY: Springer New York 2012.

Méndez, E., Salas-Ocampo, E. & Arias, C.F. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *Journal of virology* 78: 8601–8, 2004.

Meyer, C.T., Bauer, I.K., Antonio, M., Adeyemi, M., Saha, D., Oundo, J.O., et al. Prevalence of classic , MLB-clade and VA-clade Astroviruses in Kenya and The Gambia. *Virology Journal* 1–7, 2015.

Midthun, K., Greenberg, H.B., Kurtz, J.B., Gary, G.W., Lin, F.Y. & Kapikian, A.Z. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *Journal of clinical microbiology* 31: 955–62, 1993.

Mir, S.A., Shah, M.A., Mir, M.M., Dar, B.N., Greiner, R. & Roohinejad, S. Microbiological contamination of ready-to-eat vegetable salads in developing countries and potential solutions in the supply chain to control microbial pathogens. *Food Control* 85: 235–244, 2018.

Monroe, S.S., Jiang, B., Stine, S.E., Koopmans, M. & Glass, R.I. Classification of. *67*: 3611–3614, 1993.

Moser, L.A., Carter, M. & Schultz-Cherry, S. Astrovirus Increases Epithelial Barrier Permeability Independently of Viral Replication. *Journal of Virology 81*: 11937–11945, 2007.

Naccache, S.N., Peggs, K.S., Mattes, F.M., Phadke, R., Garson, J.A., Grant, P., et al. Diagnosis of Neuroinvasive Astrovirus Infection in an Immunocompromised Adult With Encephalitis by Unbiased Next-Generation Sequencing. *Clinical Infectious Diseases 60*: 919–923, 2015.

Naficy, A.B., Rao, M.R., Holmes, J.L., Abu-Elyazeed, R., Savarino, S.J., Wierzba, T.F., et al. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. *The Journal of infectious diseases 182*: 685–90, 2000.

Neres Silva, T., Dábilla, N., Souza Fiaccadori, F., das Dôres de Paula Cardoso, D., Teixeira de Sousa, T., Nunes Vieira Almeida, T., et al. Sapovirus in Fecal and Nasopharyngeal Swab Samples of Children with Symptoms of Acute Gastroenteritis. *The Pediatric Infectious Disease Journal 1*, 2017.

Nguyen, T.A., Hoang, L., Pham, L.D., Hoang, K.T. & Mizuguchi, M. Identification of Human Astrovirus Infections Among Children With Acute Gastroenteritis in the Southern Part of Vietnam During 2005 – 2006. *305*: 298–305, 2008.

Noel, J.S., Lee, T.W., Kurtz, J.B., Glass, R.I. & Monroe, S.S. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *Journal of clinical microbiology 33*: 797–801, 1995.

Nozawa, C.M., Vaz, M.G.S. & Guimarães, M.A.A.M. Detection of Astrovirus-like in diarrhoeic stool and its coexistence with Rotavirus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 27*: 238–241, 1985.

Oishi, I., Yamazaki, K., Kimoto, T., Minekawa, Y., Utagawa, E., Yamazaki, S., et al. A Large Outbreak of Acute Gastroenteritis Associated with Astrovirus among Students and Teachers in Osaka, Japan. *Journal of Infectious Diseases 170*: 439–443, 1994.

Oude Munnink, B.B., Cotten, M., Canuti, M., Deijis, M., Jebbink, M.F., van Hemert, F.J., et al. A Novel Astrovirus-Like RNA Virus Detected in Human Stool. *Virus*

Evolution 2: vew005, 2016.

Ouédraogo, N., Kaplon, J., Bonkougou, I.J.O., Traoré, A.S., Pothier, P., Barro, N., et al. Prevalence and Genetic Diversity of Enteric Viruses in Children with Diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. *PLOS ONE* 11: e0153652, 2016.

Pager, C.T. & Steele, A.D. Astrovirus-associated diarrhea in South African adults. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 35: 1452–3, 2002.

Palombo, E.A. & Bishop, R.F. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *Journal of clinical microbiology* 34: 1750–3, 1996.

Phan, T.G., Nordgren, J., Ouermi, D., Simporé, J., Nitiema, L.W., Deng, X., et al. New astrovirus in human feces from Burkina Faso. *Journal of Clinical Virology* 60: 161–164, 2014.

Pintó, R.M., Abad, F.X., Gajardo, R. & Bosch, A. Detection of infectious astroviruses in water. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1811–1813, 1996.

Pintó, R.M. & Bosch, A. Rethinking virus detection in food. In Koopmans, M., Cliver, D., & Bosch, A. (Eds.), *Foodborne viruses: progress and challenges* (pp. 171–188). Washington, DC: American Society for Microbiology Press 2008.

Quan, P.L., Wagner, T.A., Briese, T., Torgerson, T.R., Hornig, M., Tashmukhamedova, A., et al. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerging Infectious Diseases* 16: 918–925, 2010.

Resque, H.R., Munford, V., Castilho, J.G., Schmich, H., Caruzo, T.A.R. & Rácz, M.L. Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in São Paulo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 969–74, 2007.

Risco, C., Carrascosa, J.L., Pedregosa, A.M., Humphrey, C.D. & Sanchez-Fauquier, A. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *Journal of General Virology* 76: 2075–2080, 1995.

Sakamoto, T., Negishi, H., Wang, Q.H., Akihara, S., Kim, B., Nishimura, S., et al. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse

transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). *Journal of Medical Virology* 61: 326–331, 2000.

Sambrook, J. Extraction, Purification, and Analysis of Messenger RNA from Eukaryotic Cells. *Molecular Cloning: a laboratory manual* (pp. 7.3-7.79). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

Santos, R.A.T., Borges, A.M.T., da Costa, P.S.S., Teixeira, J.M.S., Giugliano, L.G., Leite, J.P.G., et al. Astrovirus infection in children living in the Central West region of Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 209–13, 2007.

Sebire, N.J. Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. *Journal of Clinical Pathology* 57: 1001–1003, 2004.

Shastri, S., Doane, A.M., Gonzales, J., Upadhyayula, U. & Bass, D.M. Prevalence of astroviruses in a children's hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2571–2574, 1998.

Silva, P.A., Alessandro, R., Santos, T., Sérgio, P., Costa, S., Marcus, J., et al. The circulation of human astrovirus genotypes in the Central West Region of Brazil. *104*: 655–658, 2009.

Siqueira, J.A.M., Oliveira, D. de S., Carvalho, T.C.N. de., Portal, T.M., Justino, M.C.A., da Silva, L.D., et al. Astrovirus infection in hospitalized children: Molecular, clinical and epidemiological features. *Journal of Clinical Virology Elsevier* 94: 79–85, 2017.

Smits, S.L., van Leeuwen, M., van der Eijk, A.A., Fraaij, P.L.A., Escher, J.C., Simon, J.H., et al. Human Astrovirus Infection in a Patient with New-Onset Celiac Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 3416–3418, 2010.

Tange, S., Zhou, Y., Nagakui-noguchi, Y., Imai, T. & Nakanishi, A. Initiation of human astrovirus type 1 infection was blocked by inhibitors of phosphoinositide. *Virology Journal* 10: 1, 2013. *Virology Journal*.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research* 25: 4876–82, 1997.

Thorne, L.G. & Goodfellow, I.G. Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology* 95: 278–291, 2014.

Tran, A., Talmud, D., Lejeune, B., Jovenin, N., Renois, F., Payan, C., et al. Prevalence of rotavirus, adenovirus, norovirus, and astrovirus infections and coinfections among hospitalized children in northern France. *Journal of clinical microbiology* 48: 1943–6, 2010.

Verma, H., Chitambar, S.D. & Gopalkrishna, V. Infection , Genetics and Evolution
Astrovirus associated acute gastroenteritis in western India : Predominance of dual serotype strains. “*Infection, Genetics and Evolution*” Elsevier B.V. 10: 575–579, 2010.

Victoria, M., Carvalho-Costa, F.A., Heinemann, M.B., Leite, J.P.G. & Miagostovich, M.P. Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Virology* 79: 939–944, 2007.

Vilariño, M.L., Le Guyader, F.S., Polo, D., Schaeffer, J., Kröl, J. & Romalde, J.L. Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 12: 145–51, 2009.

Vu, D.L., Bosch, A., Pintó, R.M. & Guix, S. Epidemiology of classic and novel human astrovirus: Gastroenteritis and beyond. *Viruses* 9: 1–23, 2017.

Vu, D.L., Cordey, S., Brito, F. & Kaiser, L. Novel human astroviruses: Novel human diseases?. *Journal of Clinical Virology* Elsevier B.V. 82: 56–63, 2016.

Wang, Y., Li, Y., Jin, Y., Li, D., Li, X. & Duan, Z. Recently Identified Novel Human Astroviruses in Children with Diarrhea, China. *Emerging Infectious Diseases* 19: 1333–5, 2013.

Willcocks, M.M., Brown, T.D., Madeley, C.R. & Carter, M.J. The complete sequence of a human astrovirus. *The Journal of general virology* 75 (Pt 7): 1785–8, 1994.

Wylie, K.M., Mihindukulasuriya, K.A., Sodergren, E., Weinstock, G.M. & Storch, G.A. Sequence Analysis of the Human Virome in Febrile and Afebrile Children. *PLoS ONE* 7: e27735, 2012.

Xavier, M. da P.T.P., Carvalho Costa, F.A., Rocha, M.S., Andrade, J. da S.R. de., Diniz, F.K.B., Andrade, T.R. de., et al. Surveillance of Human Astrovirus Infection in Brazil: The First Report of MLB1 Astrovirus. *PLOS ONE* 10: e0135687, 2015.

Xia, M., Wei, C., Wang, L., Cao, D., Meng, X.-J., Jiang, X., et al. A trivalent vaccine candidate against hepatitis E virus, norovirus, and astrovirus. *Vaccine* 34: 905–13, 2016.

Yu, W.-J., Chen, S.-Y., Tsai, C.-N., Chao, H.-C., Kong, M.-S., Chang, Y.-J., et al. Long-term impact of suboptimal rotavirus vaccines on acute gastroenteritis in hospitalized children in Northern Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association* 117: 720–726, 2018.

ANEXOS E APÊNDICES

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFG - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: MONITORAMENTO DE VÍRUS GASTROENTÉRICOS NA REGIÃO CENTRO-OESTE

Pesquisador: Divina das Dôres de Paula Cardoso

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 19948113.6.0000.5078

Instituição Proponente: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.037.509

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo relevante sobre gastroenterites em crianças menores de cinco anos de idade que fundamentará a tese de Tâmera Nunes Vieira Almeida (conforme declaração Laboratório Virologia).

Objetivo da Pesquisa:

"Geral:- Avaliar a ocorrência e a diversidade genômica dos rotavírus do grupo A, calicivírus, adenovírus, astrovírus, enterovírus, vírus Aichi e salivírus/klassevírus em crianças com até cinco anos de idade com sintomas de gastroenterite.

Específicos: - Determinar a prevalência da infecção por rotavírus do grupo A, calicivírus, adenovírus, astrovírus, enterovírus, vírus Aichi e salivírus/klassevírus; - Avaliação da existência ou não de sazonalidade para rotavírus do grupo A, calicivírus, adenovírus,

astrovírus, enterovírus, vírus Aichi e salivírus/klassevírus; - Identificar os sorotipos/genótipos circulantes de rotavírus do grupo A, calicivírus, adenovírus, astrovírus, enterovírus, vírus Aichi e salivírus/klassevírus; - Proceder à análise comparativa por meio de filogenia molecular para estabelecer a correlação entre os isolados da região Centro-Oeste e isolados de outras regiões do Brasil e do mundo;

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020

UF: GO **Município:** GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephufg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 2.037.509

- Caracterizar os genótipos dos 11 genes de rotavírus do grupo A das amostras obtidas antes e após a implantação das vacinas; - Caracterizar as constelações genotípicas considerando os 11 segmentos de rotavírus do grupo A do período anterior e após a implantação das vacinas; - Estimar as taxas de recombinação e mutação para os segmentos genômicos de rotavírus do grupo A, bem como, a pressão seletiva intracódon; - Proceder à modelagem molecular para a verificação de possíveis alterações em relação à estrutura tridimensional das proteínas de rotavírus do grupo A" (fl. 09).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: não há riscos eminentes. O risco envolve o constrangimento do procedimento da coleta do material pelo responsável legal. Não será utilizado nenhum procedimento invasivo para esse fim.

Benefícios: indireto: ampliação dos conhecimentos referentes aos vírus gastroentéricos e, por conseguinte, para a adoção e o melhoramento de medidas mais eficientes para a prevenção das infecções causadas por estes agentes virais e, com isso, contribuir para a redução da morbidade e mortalidade infantil (fl.12).

Embora não apresentado pelo pesquisador, o acesso ao resultado também será um benefício.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda na qual a pesquisadora solicita correção do Parecer Consubstanciado Número 453.268 datado de 11/11/2013 pelo exposto a seguir:

1. Item Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Consta uma análise das respostas das pendências e considera que foram plenamente atendidas e foi recomendada a aprovação desta pesquisa.

2. Situação do Parecer: Aprovado

3. No item Considerações Finais a critério do CEP consta o seguinte texto: "Projeto com pendências. Informamos que de acordo com a Resolução CNS 466/2012 o pesquisador responsável tem até 30 dias para encaminhar a este Comitê, via Plataforma Brasil, as respostas às pendências. Findo este prazo o projeto será considerado "arquivado"."

Nota-se aqui de uma incongruência entre os itens 1, 2 em relação ao item 3.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cepcufg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 2.037.509

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Encontram-se anexados e adequados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Parecer Consubstanciado Número 453.268 datado de 11/11/2013 apresenta as seguintes informações:

1. Item Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Consta uma análise das respostas das pendências e considera que foram plenamente atendidas e foi recomendada a aprovação desta pesquisa.

2. Situação do Parecer: Aprovado

3. No item Considerações Finais a critério do CEP consta o seguinte texto: "Projeto com pendências. Informamos que de acordo com a Resolução CNS 466/2012 o pesquisador responsável tem até 30 dias para encaminhar a este Comitê, via Plataforma Brasil, as respostas às pendências. Findo este prazo o projeto será considerado "arquivado"."

Nota-se aqui de uma incongruência entre os itens 1, 2 em relação ao item 3.

Diante do exposto acima faz-se necessário as seguintes correções:

Onde se lê: "Projeto com pendências. Informamos que de acordo com a Resolução CNS 466/2012 o pesquisador responsável tem até 30 dias para encaminhar a este Comitê, via Plataforma Brasil, as respostas às pendências. Findo este prazo o projeto será considerado "arquivado". Leia-se: "Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás-CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e na Norma Operacional CNS 001/13, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto. Lembramos que o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, através de Notificação via Plataforma Brasil, os relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações.

O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.

Situação: Protocolo aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto acima faz-se necessário as seguintes correções:

Onde se lê: "Projeto com pendências. Informamos que de acordo com a Resolução CNS 466/2012 o pesquisador responsável tem até 30 dias para encaminhar a este Comitê, via Plataforma Brasil, as respostas às pendências. Findo este prazo o projeto será considerado "arquivado"."

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephufg@yahoo.com.br

**UFG - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS**



Continuação do Parecer: 2.037.509

Leia-se: "Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás-CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e na Norma Operacional CNS 001/13, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto. Lembramos que o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, através de Notificação via Plataforma Brasil, os relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações.

O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares. Situação: Protocolo aprovado.

ESTE PROJETO FOI APROVADO EM 11 DE NOVEMBRO DE 2013.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_270384 E1.pdf	26/04/2017 17:11:28		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_199481.pdf	17/10/2013 08:44:18		Aceito
Outros	Declaração do Laboratório de Virologia.pdf	16/10/2013 08:08:38		Aceito
Outros	Parecer Consubstanciado do CEP_CONEP aprovando o Biorrepositório.pdf	16/10/2013 08:08:16		Aceito
Outros	Regulamento biorrepositorio.pdf	16/10/2013 08:07:56		Aceito
Outros	Justificativa referente ao questionário aplicado na entrevista do responsável legal pela criança participante do estudo.pdf	16/10/2013 08:07:37		Aceito
Outros	Questionário aplicado na entrevista do responsável legal pela criança participante do estudo.pdf	16/10/2013 08:06:26		Aceito
Outros	Informação detalhada sobre a função dos pesquisadores.pdf	16/10/2013 08:03:35		Aceito
Outros	Currículo Lattes dos pesquisadores.pdf	16/10/2013 08:01:34		Aceito
Outros	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.pdf	16/10/2013 07:59:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE.pdf	16/10/2013 07:59:24		Aceito

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephufg@yahoo.com.br

**UFG - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS**



Continuação do Parecer: 2.037.509

Ausência	TCLE.pdf	16/10/2013 07:59:24		Aceito
Outros	Documento sobre o processo de obtenção do TCLE.pdf	16/10/2013 07:59:05		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Gastro.pdf	16/10/2013 07:58:37		Aceito
Outros	Declaração de comprometimento do pesquisador responsável.pdf	16/10/2013 07:57:58		Aceito
Outros	Declaração do Orientador.pdf	16/10/2013 07:57:15		Aceito
Outros	Autorização da Chefia do SAME HMI.pdf	16/10/2013 07:57:01		Aceito
Outros	Autorização para manuseio de prontuários médicos e fichas clínicas.jpg	16/10/2013 07:56:14		Aceito
Outros	Solicitação para manuseio de prontuários e ou fichas clínicas.pdf	16/10/2013 07:55:50		Aceito
Outros	Concordância_coleta_UTI_HMI.pdf	16/10/2013 07:55:13		Aceito
Outros	Concordância_coleta_PS e enfermaria HMI.pdf	16/10/2013 07:54:57		Aceito
Outros	Concordância_coleta_HMI.pdf	16/10/2013 07:54:37		Aceito
Outros	Declaração da Chefia_IPTSP-UFG.pdf	16/10/2013 07:54:21		Aceito
Outros	Parecer do Comitê de Ética do Hospital Materno Infantil.pdf	16/10/2013 07:53:55		Aceito
Outros	Certidão do Conselho Diretor_IPTSP.jpg	16/10/2013 07:53:26		Aceito
Outros	Finalidade do estudo.pdf	16/10/2013 07:52:45		Aceito
Outros	Encaminhamento do protocolo de pesquisa.pdf	10/10/2013 11:00:37		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_199481.pdf	26/08/2013 09:18:50		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_199481.pdf	30/07/2013 21:47:54		Aceito
Folha de Rosto	Folha rosto_Gastro.JPG	30/07/2013 21:28:43		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephufg@yahoo.com.br

UFG - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



Continuação do Parecer: 2.037.509

GOIANIA, 27 de Abril de 2017

Assinado por:
JOSE MARIO COELHO MORAES
(Coordenador)

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcfg@yahoo.com.br

Página 06 de 06

Apêndice 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Título do projeto de pesquisa: Detecção de Bocavírus Humano (HBoV) em crianças com infecção respiratória e/ou gastroenterite: estudo caso-controle.

Pesquisador responsável: Teresinha Teixeira de Sousa

Orientadora: Profa. Divina das Dores de Paula Cardoso.

Nome do sujeito de Pesquisa:.....

Você autoriza a criança a participar de uma pesquisa, em que ela, seu filho (a) ou a criança pela qual você é responsável está sendo convidado (a) como voluntário (a) a fazer parte deste estudo que tem como título: **“Detecção de Bocavírus Humano (HBoV) em crianças com infecção respiratória e/ou gastroenterite: estudo caso-controle”**.

Meu nome é Teresinha Teixeira de Sousa, sou a pesquisadora responsável e minha área de atuação é de médica pneumologista, aluna de doutorado da UFG/IPTSP. A participação da criança é importante, mas antes de decidir se você quer que ela faça parte da pesquisa em que é preciso coletar fezes e secreção do nariz de crianças doentes (com infecções respiratórias e com gastroenterite-diarreia) e também daquelas sem estas doenças (que é o grupo controle, estudar a presença do vírus em quem não está doente), é preciso que o senhor ou a senhora, entenda o motivo da pesquisa: o convite está sendo feito porque os vírus respiratórios e entéricos são causas comuns de infecções respiratórias e de gastroenterite em crianças.

Vários novos vírus estão sendo descobertos e pouco se conhece sobre seu impacto (importância) em pacientes com essas doenças. Esta pesquisa pretende estudar as infecções respiratórias e gastroenterite por vírus (bocavírus humano/HBoV) em crianças com idades abaixo de 5 anos. Durante o período de um ano atendidas no Hospital Materno Infantil de Goiânia/Goiás. A pesquisa será realizada em crianças com sintomas clínicos (casos) de infecção respiratória e/ou gastroenterite e comparar o vírus também em pacientes sem estas doenças (que é o grupo controle, onde estudamos o vírus também em

quem está sadio, pois em alguns casos a criança pode ser portadora do vírus, mas não manifestar a doença). Após o atendimento do paciente pelos pediatras do hospital, um dos membros da equipe pedirá autorização para os pais e/ou responsáveis pelas crianças e explicará em detalhes todos os procedimentos para a pesquisa: haverá o preenchimento de um questionário e uma coleta de cada material (secreção nasal e fezes), em todas as crianças tanto as doentes como as saudáveis que estão no hospital por outros motivos. Todos estes procedimentos serão feitos pela pesquisadora responsável (Teresinha, médica) em sala ao lado do ambulatório no térreo e sala procedimentos no segundo andar / enfermarias do Hospital Materno Infantil, onde será garantida a privacidade da criança, por ocasião das consultas e/ou hospitalização, sem a necessidade de comparecimento ou retorno ao Hospital por motivo relacionado à Pesquisa.

Os exames de fezes e secreção nasal não substituirão os exames regularmente colhidos no Hospital como parte do seguimento médico dos pacientes. A participação de seu filho (a) ou a criança pela qual você é responsável é importante, mas você e a criança podem recusar participar da pesquisa a qualquer momento. Os procedimentos apresentam riscos baixos à integridade física da criança, serão realizados pela pesquisadora (Teresinha) e consistem em: Coleta de lavado nasal é feita através de uma pequena sonda com soro fisiológico, introduzida nas narinas e aspirada ("como uma lavagem do nariz com soro, só que aspirado o líquido de volta"), podendo ocorrer desconforto local e muito raramente pequeno sangramento nasal, sem danos posteriormente para a criança. E a coleta de fezes é espontânea, durante a evacuação, a qual será recolhida em um frasco específico, sem a utilização de medicação ou instrumentos para tal. Não acarretando nenhum desconforto direto, podendo ser acompanhado pelo responsável legal da criança. Além da coleta das amostras de secreções nasais e de fezes, o responsável pela criança deverá responder um questionário para o registro das informações pessoais da criança e a pesquisadora poderá, também, anotar dados dos prontuários. O destino dessas amostras será para o Laboratório de Virologia Humano da UFG/IPTSP, onde por exames moleculares os vírus respiratórios e entéricos serão detectados através de técnicas laboratoriais sofisticadas chamadas de PCR em tempo real (material genético dos vírus, DNA e RNA).

Informo, aos pais ou responsáveis pela criança, que as amostras (material biológico de fezes e de secreções nasais) ficarão armazenadas (guardadas) no Instituto de

Patologia e Doenças Tropicais da UFG seguindo todas as normas do regulamento aprovado pelo CEP/IPTSP a respeito de biorrepositório (segundo as normas da resolução do CNS 441 de 2011), e, caso eu tenha seu consentimento por escrito autorizando o uso para esta pesquisa e no futuro para qualquer outra pesquisa, não será necessário preencher um novo termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE); sobre o bocavírus humano e também para os outros vírus como o: rotavírus (A), calicivírus, adenovírus, astrovírus, enterovírus, aichivírus, salivírus/klassevírus, vírus respiratório sincicial, vírus influenza A e B, vírus da parainfluenza, adenovírus respiratório, rinovírus, metapneumovírus humano, coronavírus e os H1N1. Esta pesquisa estará sendo financiada com recurso do próprio laboratório e de convênios regularmente firmados sem nenhum custo para o SUS, familiares ou planos de saúde. É importante ressaltar, entretanto que a pesquisa está restrita aos procedimentos listados acima.

A participação no estudo NÃO IMPLICA na realização de outro exame e NÃO INTERFERE nas decisões sobre os remédios necessários para o tratamento do problema atual (o médico do hospital que atender seu filho (a) decidirão por procedimentos necessários, como os medicamentos ou outros exames). Estes dados procedimentos e/ou seus resultados, entretanto serão registrados para análise futura. Todos os pacientes serão convidados a participar do estudo, e a qualquer momento podem também deixar de participar, se assim o desejarem. Somente os pesquisadores e/ou equipe de pesquisa terão conhecimento de suas identidades e do questionário. Os pesquisadores pretendem publicar os resultados obtidos pela pesquisa, mas o nome e dados pessoais dos pacientes são TOTALMENTE CONFIDENCIAIS (não haverá identificação dos participantes) os dados também poderão ser utilizados em estudos futuros de outros vírus citados acima.

Em caso de recusa, você e seu filho (a) não serão penalizados (as) de forma alguma, esta recusa em nada implicará na assistência que seu filho (a) receberá. Se aceitar participar e depois retirar seu consentimento também, em nada será prejudicado. É importante destacar que, como não há despesas decorrentes da participação na pesquisa por parte do sujeito da pesquisa, neste caso, o responsável legal e a criança participante não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela sua participação. Este estudo tem início no ano de 2013 e previsão de encerramento em 2014.

Autorizo o armazenamento e guarda de amostras de secreção nasal e de fezes, formando um banco de dados/biorrepositório para investigações futuras, e que toda nova

pesquisa a ser feita com o material será submetida à aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da CONEP e com a dispensa de novo consentimento a cada pesquisa (Res. CNS nº 347/2005-1.1, 1.2, 1.3, 1.4).

Após receber os esclarecimentos e as informações, no caso de aceitar fazer parte do estudo, você deverá rubricar todas as páginas e assinar ao final deste documento e, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. A qualquer momento, antes e durante a pesquisa, você poderá solicitar esclarecimentos e em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Teresinha Teixeira de Sousa no telefone: (62) 81595675. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Materno Infantil de Goiânia Telefone (62) 3201-3374.

Local e Data: Goiânia,/...../.....

Nome e Assinatura do pesquisador _____

Consentimento da participação da criança como sujeito da pesquisa pelo responsável legal

Eu, _____, RG _____, CPF _____, endereço _____, abaixo assinado concordo que _____ cuja responsabilidade legal me é conferida autorizo que a criança participe do estudo **"Detecção de Bocavírus Humano (HBoV) em crianças com infecções respiratórias e/ou gastroenterite: estudo caso-controle"**, como sujeito de pesquisa.

Fui devidamente informado e esclarecido pelo Pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos envolvidos, assim com os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação da criança pela qual sou responsável legal.

Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do seu acompanhamento assistencial/tratamento e que todas as informações pessoais obtidas serão mantidas em sigilo. Recebi uma cópia deste documento com todas as páginas rubricadas e assinadas por mim e pelo pesquisador participante deste estudo. Autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo sobre o bocavírus humano e, ainda, a formação de um banco de dados e um biorrepositório das amostras (fezes e de secreções nasais) cujo regulamento foi aprovado pelo CEP/IPTSP/UFG, seguindo as normas da resolução do CNS 441 de 2011. E que as amostras obtidas poderão ser utilizadas em pesquisas futuras sem a necessidade do preenchimento de um novo termo de consentimento (TCLE); para o bocavírus humano e para outros vírus como o: rotavírus (A), calicivírus, adenovírus, astrovírus, enterovírus, aichi vírus, salivírus/klassevírus,

vírus respiratório sincicial, vírus influenza A e B, vírus da parainfluenza, adenovírus respiratório, rinovírus, metapneumovírus humano, coronavírus e os H1N1.

Local e data: _____

Nome e assinatura do sujeito ou responsável legal: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas

Nome e assinatura: _____

Nome e assinatura: _____

Apêndice 2 – Ficha de Investigação Clínica

Ficha de investigação clínica

DATA:/...../..... Registro geral (.....) N° Amostra (.....)

Controle: 1.1 Fezes assintomático () 1.2 Swab assintomático ()

Caso: 2.1 Sintomas GEA () 2.2 Sintomas respiratórios ()

Amostra: 3.1 Fezes () 3.2 Swab ()

Dados epidemiológicos

NOME:

COLETA: DATA (...../...../.....) HORA (.....)

UNIDADE COLETA: () PS () ENFERMARIA ADMISSÃO:

SEXO: () MASC. () FEM.

DATA DE NASCIMENTO:/...../..... **IDADE:**

Natural: Procedência:

Endereço:

Bairro:..... Cidade:..... UF:.....

Telefone: ()..... Nome responsável:

Profissão: Mãe Pai.....

Renda familiar (em salário mínimo):

Habitação: () própria () alugada

Asfalto: sim() não() Água: () tratada () cisterna () poço Esgoto: sim() não()

RAÇA/COR: () branca, () morena, () negra, () indígena

ESCOLARIDADE: () pública, () creche, () particular

ASSISTÊNCIA MÉDICA: () SUS, () plano de saúde, () particular

ALIMENTAÇÃO: () leite materno, () leite materno e outro, () outro

TIPO PARTO: () normal, () cesariana

Sintomatologia:

A. Respiratório:

Febre: sim() não(), Tosse () sim () não, Dispnéia/Chiado () sim () não

SaO2:...../ Rad TX:...../ HMG:

Ausulta:/ Temperatura:

B. GASTROENTERITE:

Diarréia: sim() não()/ Frequência: 1 a 2x (), >2x ()
Aspecto: líquida(), semi-líquida(), pastosa(), sangue(), fétida()
Febre: sim() não()/ Vômitos: sim() não()/ Dor abdominal: sim() não()

Antecedentes epidemiológicos:

Contato caso suspeito (Respiratório e/ou GEA): ()domicílio, ()creche, () escola

Uso de medicação antes coleta: sim() não(), qual?

Vacinação completa: sim() não()

Vacina contra gripe: sim() não() Última dose:.....

Vacina rotavírus (VORH)(), Rotarix (), Rotatec() – 1ªdose(), 2ªdose ()

Comprovação: sim(), não()

Diagnóstico clínico prontuário:.....

Outras patologias/cirurgias: