

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDO VICENTINI

**ESTUDO MOLECULAR DE VÍRUS ASSOCIADOS À DIARREIA EM
CRIANÇAS QUILOMBOLAS DO NORTE DO ESTADO DO ESPÍRITO
SANTO**

2013

FERNANDO VICENTINI

**Estudo molecular de vírus associados à diarreia em
crianças quilombolas do norte do estado do Espírito
Santo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Profa. Dra. Liliana Cruz Spano

Coorientador: Dr. José Paulo Gagliardi Leite

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

C348d Vicentini, Fernando, 1973-
Estudo molecular de vírus associados à diarreia em crianças
quilombolas do norte do estado do Espírito Santo / Fernando
Vicentini. – 2013.
123 f. : il.

Orientadora: Liliana Cruz Spano.
Coorientador: José Paulo Gagliardi Leite.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Espírito Santo,
Centro de Ciências da Saúde.

1. Gastroenterite. 2. Quilombos – Espírito Santo (Estado). 3.
Norovírus. 4. Adenovírus. I. Spano, Liliana Cruz. II. Leite, José
Paulo Gagliardi. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro
de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU:61



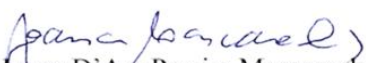
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS


PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
TESE DE DOUTORADO


O doutorando FERNANDO VICENTINI apresentou a tese intitulada: “ESTUDO MOLECULAR DE VÍRUS ASSOCIADOS À DIARREIA EM CRIANÇAS QUILOMBOLAS DO NORTE DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de **Doutor em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

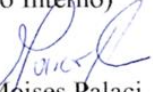
Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a tese para habilitar o tecnólogo em saúde FERNANDO VICENTINI a obter o Grau de DOUTOR EM DOENÇAS INFECCIOSAS.


Vitória, ES, 29 de agosto de 2013



Prof. Dra. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas
(Membro Externo)


Prof. Dr. Tulio Machado Fumian
(Membro Externo)


Prof. Dra. Angélica Espinosa Barbosa Miranda
(Membro Interno)


Prof. Dr. Moises Palaci
(Membro Interno)


Prof. Dra. Lijana Cruz Spano
(Orientadora)


Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite
(Coorientador)

Dedico este trabalho a todas as crianças negras e pobres do Brasil. Que elas tenham a coragem e as condições necessárias para entrar na Universidade não apenas como dados estatísticos, mas sim como protagonistas de sua ascensão social.

Dedico também à Liliana Cruz Spano, que apesar de todas as minhas limitações intelectuais, aceitou este enorme desafio.

Dedico igualmente aos amores da minha vida, em ordem cronológica: meu pai Ricardo, minha mãe Irení, minha Deusa Angélica, minhas filhas Lia, Letícia e Luana, pelo olhar permanente de crédito, compreensão e entusiasmo.

Dedico a todos os meus professores de dentro e fora das salas, especialmente representados pela "Dona" Lauzília, "Dona" Edilma e Profa. Lúcia.

Dedico a todos os educadores por opção, abnegados e sonhadores, representados aqui da forma mais brilhante por Maria Silvia Viccari Gatti, minha orientadora de mestrado e Rubem Alves, inspiração e motivação.

Dedico aos meus amigos pelas horas éticas fundamentais em momentos de crise.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primordialmente a Deus.

Agradeço às agências de fomento, que viabilizaram este trabalho, CNPq, CAPES, FAPES, PPSUS.

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo que me acolheu enquanto docente e neste trabalho como discente.

Agradeço às Pró-Reitorias de Pós-Graduação, de Extensão e de Planejamento.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas por ter apostado neste trabalho.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. José Paulo Gagliardi Leite pelo apoio incondicional.

Agradeço às Secretarias Municipais de Saúde dos Municípios de São Mateus e Conceição da Barra, no Espírito Santo.

Agradeço às equipes de ESF e PACS dos dois municípios.

Agradeço às comunidades do Território Sapê do Norte e região, pela acolhida, aceitação e colaboração.

Agradeço às Agentes Comunitárias de Saúde e lideranças comunitárias de cada região trabalhada.

Agradeço às mães e outros responsáveis pelas crianças que foram envolvidas neste trabalho.

Agradeço aos técnicos da Universidade Federal do Espírito Santo, especialmente do DCS/Ceunes e do Depto de Patologia/CCS.

Agradeço aos discentes de graduação e pós-graduação que estiveram envolvidos neste trabalho, especialmente à Yohanna, Débora, Murilo, Mariane, Diego, Lorena, Cíntia, Taísia entre tantos outros.

Agradeço aos meus amigos de caminhada acadêmica, em especial ao Wilson Denadai pela parceria imprescindível à realização deste sonho.

Agradeço a todos os colaboradores do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ e em especial aos coordenadores Dra. Marize Pereira Miagostovich e Dr. José Paulo Gagliardi Leite, pela acolhida de sempre.

Agradeço a toda equipe 5 do INSERM / Nantes, França, especialmente ao Diretor Dr. Jacques Le Pendu, por apostar neste trabalho e me acolher em Nantes.

Agradeço às dificuldades financeiras que a vida me trouxe, pois não há motivação maior para um trabalho desta natureza.

Dia de Graça

Hoje é manhã de carnaval (ao esplendor)

As escolas vão desfilar (garbosamente)

Aquela gente de cor com a imponência de um rei, vai pisar na passarela (salve a Portela)

Vamos esquecer os desenganos (que passamos)

Viver alegria que sonhamos (durante o ano)

Damos o nosso coração, alegria e amor a todos sem distinção de cor

Mas depois da ilusão, coitado

Negro volta ao humilde barracão

Negro acorda é hora de acordar

Não negue a raça

Torne toda manhã dia de graça

Negro não se humilhe nem humilhe a ninguém

Todas as raças já foram escravas também

E deixa de ser rei só na folia e faça da sua Maria uma rainha todos os dias

E cante o samba na universidade

E verás que seu filho será príncipe de verdade

Aí então jamais tu voltarás ao barracão

Antônio Candeia Filho, 17/8/35 - 16/11/78, fundou a **Escola de Samba Quilombo** em dezembro de 1975.

"...Não nos interessávamos por aquilo que ele havia memorizado dos livros. Muitos idiotas tem boa memória. Interessávamos por aquilo que ele pensava...

...Papaguear os pensamentos dos outros, tudo bem. Para isso eles haviam sido treinados durante toda a sua carreira escolar, a partir da infância. Mas falar sobre os próprios pensamentos - ah! isso não lhes havia sido ensinado..."

Rubem Alves

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO (JUSTIFICATIVA)	01
2 OBJETIVOS	04
<i>2.1 Objetivo geral</i>	04
<i>2.2 Objetivos específicos</i>	04
3 REVISÃO DA LITERATURA	05
<i>3.1 Rotavírus</i>	07
<i>3.1.1 Classificação e estrutura de partícula</i>	07
<i>3.1.2 Transmissão aspectos clínicos e epidemiologia</i>	09
<i>3.2 Norovírus</i>	10
<i>3.2.1 Classificação e estrutura da partícula</i>	10
<i>3.2.2 Transmissão, aspectos clínicos e epidemiologia</i>	13
<i>3.2.3 Relação dos NoV e HBGA</i>	14
<i>3.3 Adenovírus</i>	17
<i>3.3.1 Classificação e estrutura da partícula</i>	17
<i>3.3.2 Transmissão, aspectos clínicos e epidemiologia</i>	19
<i>3.4 Astrovírus</i>	21
<i>3.4.1 Classificação e estrutura da partícula</i>	21
<i>3.4.2 Transmissão, aspectos clínicos e epidemiologia</i>	23
<i>3.5 Apresentação do estudo desenvolvido</i>	23
4 METODOLOGIA	25
<i>4.1 POPULAÇÃO</i>	25
<i>4.2 ESTRATÉGIAS DE COLETA DE ESPÉCIMES BIOLÓGICOS</i>	26
<i>4.2.1 Municípios parceiros</i>	26
<i>4.2.2 A amostra fecal</i>	26
<i>4.2.3 Amostragem</i>	26
<i>4.2.4 Coleta de espécime fecal</i>	27

4.2.5 Coleta de sangue	27
4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS FECAIS	28
4.3.1 Preparo da suspensão fecal	28
4.3.2 Extração de ácido nucléico viral	28
4.3.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)	28
4.4 DETECÇÃO VIRAL E ANÁLISE MOLECULAR	29
4.4.1 Rotavírus	29
4.4.1.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA)	29
4.4.1.2 Ensaio imuno-enzimático (EIE - Elisa)	29
4.4.1.3 Reação em Cadeia pela Polimerase	30
4.4.1.3.1 Detecção e tipagem G e P de rotavírus.	30
4.4.2 Adenovírus	30
4.4.2.1 Reação em Cadeia pela Polimerase	30
4.4.2.2 Determinação da espécie por RFLP	31
4.4.2.3 Determinação da espécie e tipo pelo sequenciamento parcial do gene hexon	32
4.4.3 Norovírus	32
4.4.4 Determinação do genótipo de norovírus	33
4.4.5 Astrovírus	34
4.5 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE GRUPOS SANGUÍNEOS ABH E LEWIS	35
4.5.1 Fenotipagem sorológica dos sistemas ABO e Lewis	35
4.5.2 Extração do DNA para a genotipagem de FUT 2 e FUT 3	35
4.5.3 Amplificação gênica do FUT 2 e avaliação da mutação G428A	35
4.5.4 - Amplificação gênica alelo específica do gene FUT3	36
4.6 ANÁLISE DE DADOS	37

4.7 ASPECTOS ÉTICOS	38
5 ARTIGO (S)	39
5.1 Publicado na Revista PLoS ONE	40
5.2 Submetido à Revista J Clin Virol	66
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
7 CONCLUSÕES	86
8 PERSPECTIVAS	88
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
10 ANEXOS	116
10.1 ANEXO I - CARACTERIZAÇÃO DO TERRITÓRIO QUILOMBOLA	117
10.2 ANEXO II - TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µl	Microlitro
µM	Micromolar
ACS	Agente Comunitário de Saúde
CEUNES	Centro Universitário Norte do Espírito Santo
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Tri-Fosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetraacético)
ESF	Estratégia Saúde da Família
FUT	Fucosiltransferase
g	Grama
HAdV	<i>Human adenovirus</i> (Adenovírus humano)
HBGAs	<i>Histo-Blood Group Antigens</i> (antígenos do grupo histo-sanguíneo)
KDa	Kilodalton
Le	Lewis (Tipo de antígeno de grupo sanguíneo)
LGIIn	Laboratório de Gastroenterite Infecciosa da UFES
ME	Microscopia Eletrônica
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N	Domínio N-terminal
NoV	Norovírus
nt	Nucleotídeo
N	N-terminal
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Região de leitura aberta)
P	Domínio <i>Protuding</i> (Domínio protuberante)

kpb	Kilo Pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia pela polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomolar
Pol RNA	RNA polimerase dependente de RNA
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição)
RHDV	<i>Rabbit hemorrhagic disease vírus</i> (Vírus da doença hemorrágica do coelho)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico)
RT	<i>Reverse Transcription</i> (Transcrição Reversa)
S	Domínio <i>Shell</i>
s	Segundos
TA	Temperatura ambiente
UBS	Unidades Básicas de Saúde
VLPs	<i>Virus-Like Particles</i> (Partículas semelhantes ao vírion)
VP	<i>Viral protein</i> (proteína viral)

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E FLUXOGRAMA

Figura 01. Partículas de rotavírus observadas à microscopia eletrônica	08
Figura. 02. Organização estrutural dos RV.	09
Figura 03. Árvore filogenética dos genogrupos e genótipos de NoV.	11
Figura 04. Microscopia eletrônica de partículas de norovírus.	12
Figura 05. Diagrama com a organização genômica dos norovírus.	13
Figura 06. Síntese dos antígenos histo-sanguíneos ABH e Lewis a partir do precursor Tipo 1.	16
Figura 07. Microscopia eletrônica de partícula de HAdV.	18
Figura 08. Organização genômica dos HAdV.	18
Figura 09. Estrutura organizacional das proteínas estruturais na partícula de HAdV.	19
Figura 10: Microscopia eletrônica de partículas de AstV.	21
Figura 11. Modelo estrutural do capsídeo do AstV.	22
Figura 12. Organização genômica dos AstV.	22
Fluxograma 01. Apresentação das técnicas realizadas para a detecção e caracterização molecular dos vírus.	24
Figura 13. Mapa do Território Sapê do Norte.	25
Quadro 1. Iniciadores utilizados nas reações de PCR para adenovírus.	31
Quadro 02. Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados no PCR e sequenciamento dos norovírus.	33
Quadro 3. Iniciadores utilizados para a detecção das mutações nos genes FUT2 (mutação G428A) e FUT3.	37
Figura 14. Localização geográfica das comunidades Quilombolas.	118
Figura 15. Comunidades próximas à zona urbana.	118
Figura 16. Atividades produtivas.	119
Figura 17. Proximidade com campos de petróleo e gás natural.	119
Figura 18. Fontes de água à população.	120

Figura 19. Condições de moradia.

121

RESUMO

A diarreia é um importante problema de saúde pública e suas consequências são agravadas pela falta de atendimento médico, diagnóstico e tratamento de suporte, expondo sobremaneira as crianças à morte. Este trabalho objetivou realizar uma vigilância entre 2007 e 2010 com detecção seguida de análise filogenética molecular de agentes virais encontrados nas fezes de crianças com (sintomáticas) e sem diarreia (assintomáticas), menores de 12 anos, e a susceptibilidade à infecção por norovírus conforme antígeno de grupo sanguíneo (HBGA). Foi obtido um total de 574 amostras de fezes e pesquisados: (i) rotavírus (RV) por eletroforese em gel de poliacrilamida e ensaio imunoenzimático; (ii) norovírus (NoV), por RT-PCR da região B do genoma viral e genogrupos e genótipos determinados por PCR e sequenciamento, respectivamente, para regiões C e D; (iii) adenovírus (HAdV), por PCR e nested-PCR para gene do hexon, espécie e genótipo analisados com enzima de restrição *SaI* e sequenciamento e; (iv) astrovírus (AstV), por PCR em tempo real para ORF2. Os fenótipos HBGA foram determinados por gel-centrifugação e os genes *FUT2* e *FUT3* analisados por PCR e sequenciamento a partir de sangue e saliva, respectivamente, obtidos de crianças infectadas por NoV e de adultos. Nenhuma amostra foi positiva para RV ou AstV enquanto NoV foram detectados em 9,2% (12/131) das crianças sintomáticas e em 1,5% (4/266) das assintomáticas, 50% do total em ≤ 12 meses, embora estas representassem 10% das amostras obtidas. Genogrupos GI e GII corresponderam a 12,5% e 87,5%, respectivamente, com os seguintes genótipos: GII.4 (25%), GII.12 (25%), GII.6 (12,5%) e GI.1 (6,3%), GI.3 (12,5%) e GI.4 (6,3%). As crianças infectadas com NoV pertenceram aos seguintes fenótipos de HBGA: A (n=6), O (n=6) e B (n=2); 13 deles classificados como secretores (*Se*) e um, não secretor (*se*). Foram encontradas mutações $Se^{40,171,216,357,428,739,960}$ para o gene *FUT2* e mutações $Le^{59, 202, 314}$ para *FUT3*. A única criança com fenótipo *se*, foi infectada por NoV GI, enquanto as *Se*, foram infectadas por GI e GII. A frequência total de HAdV foi de 27,8% (59/212), com 30,1% (40/133) e 24,1% (19/79) em sintomáticas e assintomáticas, respectivamente. As 33 amostras das crianças sintomáticas pertenceram às seguintes espécies: 3 (9,1%) A, 6 (18,2%) B, 18 (54,5%) C, 2 (6,1%) D, 4 (12,1%) F. HAdV-F e HAdV-A constituíram 20% do total e infectaram somente crianças ≤ 5 anos. HAdV-F ocorreu igualmente entre as sintomáticas e assintomáticas. HAdV-E e G não foram detectadas. Em conclusão, este estudo mostrou: (i) taxas de infecção por NoV em crianças quilombolas sintomáticas e assintomáticas consistentes com outros estudos, no entanto, as ≤ 12 meses foram sete vezes mais afetadas do que aquelas 1-5 anos; (ii) NoV GII.12 foi tão frequente quanto GII.4 e os genótipos GI.1 e GI.4

foram descritos pela primeira vez no Brasil; (iii) perfil de HBGA revelou população idêntica à dos outros continentes, incluindo a única mutação até então, exclusiva de negros africanos e nenhum padrão de susceptibilidade ou resistência associada ao HBGA foi inferida para os NoV e; (iv) HAdV-F e HAdV-A foram responsáveis por 1/5 do total dos tipos HAdV e HAdV-F41 foi excretado igualmente entre sintomáticos e assintomáticos. Este é o primeiro estudo no Brasil sobre RV, NoV, HAdV e AstV em crianças quilombolas através de caracterização molecular das estirpes, o que permitiu detectar a alta frequência de HAdV e ampla diversidade genética entre NoV e HAdV e aparente ausência de circulação de RV e AstV nas crianças das comunidades quilombolas.

Palavras-chave: Crianças Quilombolas, filogenia molecular, gastroenterite viral, HAdV (Adenovirus humano), HBGA (Antígenos de grupo histo-sanguíneo), NoV (Norovirus).

ABSTRACT

Diarrhea is a major public health problem and its consequences are aggravated by lack of medical care, diagnosis and treatment support, greatly exposing children to death. This study aimed to conduct a surveillance between 2007 and 2010 followed by detection and molecular phylogenetic analysis of viral agents found in the feces of children with (symptomatic) and without diarrhea (asymptomatic), under 12 years, and the susceptibility to norovirus infection according to blood group antigen (HBGA). A total of 574 fecal samples were obtained and searched for: (i) rotavirus (RV), by polyacrylamide gel electrophoresis and enzyme immunoassay (ii) norovirus (NoV), by RT-PCR of the B viral genome region and genotypes and genogroups determined by PCR amplification and sequencing, respectively, for the regions C and D; (iii) adenovirus (HAdV), by PCR and nested-PCR for the *hexon* gene, species and genotype analysed by restriction enzyme *SaI* and sequenced and; (iv) astrovirus (AstV), by real-time PCR for ORF2. HBGA phenotypes were determined by gel-spinning and *FUT2* and *FUT3* genes, analyzed by PCR and sequencing from blood and saliva, respectively, obtained from children infected with NoV and adults. No sample was positive for RV or AstV while NoV were detected in 9.2% (12/131) of symptomatic and in 1.5% (4/266) of asymptomatic children: 50% of the total in ≤ 12 months, although these children represented 10% of the cases. GI and GII genogroups corresponded to 12.5% and 87.5%, respectively, with the following genotypes: GII.4 (25%), GII.12 (25%), GII.6 (12.5%), GI .1 (6.3%), GI.3 (12.5%) and GI.4 (6.3%). Children infected with NoV belonged to the following HBGA phenotypes: A (n=6) (n=6) and B (n=2), 13 were classified as secretory (*Se*) and one non-secretory (*se*). $Se^{40,171,216,357,428,739,960}$ mutations were found for the *FUT2* gene and $Le^{59,202,314}$, to *FUT3*. The only *se* child was infected by GI, while *Se* were infected by GI and GII. The overall frequency of HAdV was 27.8% (59/212), 30.1% (40/133) and 24.1% (19/79) in symptomatic and asymptomatic children, respectively. The 33 samples from symptomatic children belonged to the following species: 3 (9.1%) A, 6 (18.2%) B, 18 (54.5%) C, 2 (6.1%) D and 4 (12.1 %) F. HAdV-F and HAdV-A constituted 20% of the total and only infected children ≤ 5 years. HAdV-F occurred in the same rate between symptomatic and asymptomatic. HAdV-E and G were not detected. In conclusion, this study showed: (i) rates of NoV infection in symptomatic and asymptomatic quilombola children consistent with other studies, however, those ≤ 12 months were seven times more affected than those 1-5 years; (ii) NoV GII.12 was equally frequent as GII.4 and GI.1 and GI.4 genotypes were for the first time described in Brazil; (iii) HBGA revealed population profile similar to other continents, including the single mutation hitherto exclusive of Black Africans and no pattern of susceptibility or resistance associated HBGA was inferred to NoV; (iv) HAdV-F

and HAdV-A accounted for 1/5 of the total HAdV types and HAdV-F41 was excreted equally among symptomatic and asymptomatic. This is the first study in Brazil of RV, NoV, HAdV and AstV in quilombola children through molecular characterization of the strains, which allowed us to detect the high frequency of HAdV and the genetic diversity of NoV and HadV. Moreover, there was an apparent lack of circulation of RV and AstV in children of quilombola communities.

KEYWORDS: Quilombola children, molecular phylogeny, viral gastroenteritis, HAdV (Human Adenovirus), HBGA (Human Histo-Blood Group Antigen), NoV (Norovirus).

1 INTRODUÇÃO (JUSTIFICATIVA)

A diarreia é uma importante causa de morbimortalidade infantil, representando um dos principais problemas de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento.

Apesar de bem sucedidos os esforços mundiais nas últimas décadas para minimizar os efeitos das doenças preveníveis, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a diarreia e a pneumonia ainda respondem por mais de 2 milhões de mortes anuais, com as diarreias respondendo por pelo menos 800.000 delas.

Maiores índices de mortalidade infantil devido às gastroenterites são observados em regiões com baixo índice de desenvolvimento humano, de saneamento e estão associados às más condições de higiene, assim como às condições de armazenamento e preparo dos alimentos (CDC, 2013a). Estas condições de vida ampliam a transmissão dos diversos patógenos de etiologia bacteriana, parasitária e viral, embora com menor impacto neste último (CUNHA, 2001; MELLI & WALDMAN, 2011).

Interferem nas características epidemiológicas, a natureza biológica dos agentes etiológicos, como resistência em ambiente aberto como solo ou água e tamanho das partículas para os vírus ou células para os demais, facilitando a manutenção em suspensão e aerossóis e dificultando sua remoção das superfícies corporais ou fômites (MIAGOSTOVICH *et al.*, 2008; CORRÊA *et al.*, 2012).

A etiologia viral se constitui na causa mais importante de acometimento entérico, mesmo em condições adequadas de saneamento básico, sendo os principais responsáveis pela morbidade em regiões desenvolvidas e de mortalidade em regiões em desenvolvimento, assim como nos grandes surtos em pessoas de todas as idades (NATCHU & BHATNAGAR, 2013; HALL, 2013).

Os riscos de morte são majorados para as crianças de comunidades mais pobres que vivem em precárias condições higiênico-sanitárias, como nas Comunidades Quilombolas. Foram pesquisados neste estudo, em casos de

diarreia comunitária, os principais agentes etiológicos virais (rotavírus, norovírus, adenovírus e astrovírus), através de metodologias de detecção altamente sensíveis e específicas e, caracterizados o perfil molecular dos patógenos que acometem as crianças quilombolas de até onze anos de idade. Foram realizadas análises filogenéticas para avaliar a similaridade das cepas circulantes localmente, com aquelas encontradas no Brasil e no mundo, mas especialmente em populações de etnia semelhante como a região central do continente africano, origem dos ancestrais da população quilombola estudada, apesar dos países africanos de língua portuguesa serem menos estudados que os demais colonizados por países de língua inglesa e francesa.

Os quilombolas são descendentes de negros africanos trazidos para o país no tempo do Brasil colonial como escravos para trabalharem nas fazendas, principalmente de café e cana-de-açúcar. Fugindo dos maus tratos impostos pelos seus proprietários, acabaram por criar comunidades afastadas e autônomas denominadas Quilombos. Trata-se hoje de uma população rural, pobre e representante fiel da população negra introduzida no Brasil, etnicamente mais homogênea em função dos endocruzamentos familiares que se sucederam desde o final da escravatura e a formação de cada Quilombo.

Susceptibilidade relacionada aos antígeno de grupo sanguíneo (*Histo-Blood Group Antigen- HBGA*) vem sendo descrita para alguns agentes infecciosos como para o norovírus (NoV) (TAUBE *et al.*, 2010). Os antígenos histo-sanguíneos ABH e Lewis (HBGA) estão relacionados à adsorção dos NoV ao epitélio intestinal. Considerando o polimorfismo genético, 20% da população mundial não expressam esses antígenos (PATNAIK *et al.*, 2011) e foram considerados naturalmente resistentes aos NoV (LINDSMITH *et al.*, 2003). Apesar de estudos recentes mostrarem que essa relação pode ser verdadeira apenas para determinados genogrupos ou ainda genótipos de NoV, busca-se identificar se as diferenças genéticas entre os povos dos vários continentes são refletidas na relação homem-NoV. Atualmente não há evidências genéticas que elucidem maior susceptibilidade ou resistência entre os povos (LE PENDU, 2006; VICENTINI *et al.*, 2013).

Desta forma, o desafio proposto foi elucidar a etiologia da diarreia viral em crianças de comunidades quilombolas do interior de dois municípios vizinhos, São Mateus e Conceição da Barra, no norte do estado, transição da região Sudeste para a Nordeste e porta para o semiárido brasileiro.

Trata-se, portanto, do primeiro estudo sobre diarreia de origem viral, caracterização molecular de NoV e HAdV em população negra e quilombola do norte do estado do Espírito Santo e de caracterização de polimorfismo dos genes de HBGA para análise de susceptibilidade à infecção por NoV.

Este documento de tese foi estruturado seguindo orientação do PPGDI para teses resumidas. Assim, todos os resultados e discussões estão limitados aos dois artigos científicos produzidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a circulação de vírus causadores de diarreia em crianças sintomáticas e assintomáticas pertencentes ao território quilombola Sapê do Norte, no norte do Espírito Santo, caracteriza-los molecularmente e evidenciar susceptibilidade da população aos norovírus.

2.2 Objetivos específicos

Detectar rotavírus através da técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – EGPA e Ensaio Imuno-Enzimático - EIE;

Detectar adenovírus pela técnica de PCR;

Detectar norovírus e astrovírus pela técnica de RT- PCR;

Definir espécie de adenovírus através de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e de sequenciamento genético e do tipo por sequenciamento genético;

Determinar genogrupo e genótipo de norovírus por PCR e sequenciamento genético;

Definir o perfil dos genes da Fucosil-transferase 2 e 3 para todas as crianças infectadas por norovírus e analisar susceptibilidade à infecção.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A diarreia é uma importante causa de morbi-mortalidade infantil, matando mais que a malária, o sarampo e a AIDS juntas e, desconsiderando-se a morte neonatal, representam a segunda causa de morte, sendo menos importante apenas que a pneumonia (LIU *et al.*, 2012).

Estima-se em mais de 800.000 mortes anuais de crianças por doença diarreica no mundo, tendo os rotavírus (RV) historicamente como a principal causa (BERN *et al.*, 1992; GENTSH *et al.*, 1996; NATCHU & BHATNAGAR, 2013). Essa doença pode ser decorrente de infecções por muitos agentes etiológicos que diferem entre si, na sua natureza, sua virulência, forma de controle e prevenção (ALBERT *et al.*, 1999; ALAIN & DENIS, 2007).

A população de baixo nível socioeconômico tem um maior risco de adoecimento por diarreia com consequentes agravos nutricionais, comprometimento do crescimento e desenvolvimento cognitivo e antecipação da morte, sobretudo, crianças oriundas de famílias que vivem em situação de pobreza e miséria (MELLI & WALDMAN, 2011). Os números são ainda mais agressivos para populações negras e rurais (MOY *et al.*, 1991; MANUN'EBO *et al.*, 1994; CUNHA, 2001; OLIVEIRA, 2003).

Os riscos de morte associadas à diarreia, são majorados quando associados às crianças de comunidades mais pobres, onde não se dispõe de tratamento de suporte ou o acesso é mais restrito ao saneamento básico e aos serviços de saúde (CUNHA, 2001; OLIVEIRA, 2003; Centers for Disease Control and Prevention, 2003; CHOR, 2013). Entretanto, mesmo em países desenvolvidos como os EUA, o número de mortes por diarreia nos últimos anos mais que duplicou (HALL, 2013), tendo *Clostridium difficile* e os NoV como um dos principais agentes associados à morte.

No Brasil, a desigualdade de atendimento e oferta pública de serviços de saúde tem aumentado nos últimos anos as diferenças entre as taxas de mortalidade infantil entre as crianças filhas de mulheres brancas e negras (CUNHA, 2001; OLIVEIRA, 2003).

Verificou-se uma queda de 43% para brancos e de 25% para negros na mortalidade infantil entre 1977 e 1993 e um aumento entre as diferenças relativas de mortalidade infantil de 21 para 40% entre 1980 e 2000. Nas zonas rurais, percebe-se um acréscimo de até 67 mortes a mais por grupo de mil nascidos vivos entre os negros do que entre os brancos residentes nas áreas urbanas (CUNHA, 2001).

Mesmo em países desenvolvidos se verifica a desigualdade de atenção à saúde das populações brancas e negras. Yen *et al.* (2010) mostra a disparidade étnica da demanda por hospitalização nos Estados Unidos da América entre crianças que tomaram ou não a vacina para RV. O impacto da vacina sobre as crianças negras cresce em importância se considerada a demanda por atendimento em Unidades de Emergência por crianças negras maior do que para crianças brancas. Esses dados evidenciam que a vacina para RV pode diminuir índices de internação, desidratação e morte entre crianças, possivelmente com maior impacto sobre a saúde das populações negras (PONT *et al.*, 2009).

O decréscimo de 75% na mortalidade infantil observado no Brasil no século passado se deve muito ao controle das doenças diarreicas (CUNHA, 2001; OLIVEIRA, 2003). Entre os principais agentes de diarreia reconhecidos em todo o mundo está o RV que acomete principalmente crianças menores de três anos de idade para o qual o Ministério da Saúde introduziu no Sistema Único de Saúde no ano de 2006 a distribuição gratuita de vacina (LIU *et al.*, 2012).

Os NoV, por sua vez, representam a principal causa de diarreia viral em todas as faixas etárias e são responsáveis por até 90% dos surtos não bacterianos (PATEL *et al.*, 2008; GLASS *et al.*, 2009). As populações mais susceptíveis são principalmente indivíduos institucionalizados, como casas de saúde para idosos, hospitais, creches e outras situações de grande concentração humana, como convenções, balneários turísticos e viagens em navios transatlânticos (LOPMAN *et al.*, 2004; WIDDOWSON *et al.*, 2004; MATTHEWS *et al.*, 2012; HALL A, 2013). Existem outros agentes virais de diarreia importantes como os adenovírus humanos (HAdV) e os astrovírus (AstV), além de outros menos prevalentes (BON *et al.*, 1999; CLARK AND MCKENDRICK, 2004). Dentre os

patógenos intestinais merecem ainda atenção as bactérias como os patótipos diarreio gênicos de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium difficile* dentre outras, (LYMAN *et al.*, 2009; HALL, 2013; LOZER *et al.*, 2013) e os protozoários representados pelas *Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium parvum* (NATCHU & BHATNAGAR, 2013).

3.1 Rotavírus

3.1.1 Classificação e estrutura de partícula

Os RV do grupo A são historicamente os mais importantes agentes associados à diarreia nos países em desenvolvimento e responsáveis por alta taxa de hospitalização (KAPIKIAN, 2001; CARVALHO-COSTA *et al.*, 2006; KOCH & WIESE-POSSELT, 2011, NATCHU & BHATNAGAR, 2013).

Pertencentes à família *Reoviridae*, sub-família *Sedoreovirinae* e gênero *Rotavirus* (ICTV), são classificados sorologicamente em grupos, subgrupos e sorotipos em função de seus antígenos de capsídeo externo e interno, assim como em genótipos num sistema binário associados aos genes que codificam as proteínas VP4 e VP7, denominado genótipo P (para a VP4) e G (para VP7) (ESTES *et al.*, 2001). Mais recentemente, um sistema de classificação utilizando a sequência genética dos 11 segmentos de RNA de fita dupla (RNA fd) que compõe seu genoma foi proposto (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008a). Segundo a proposta, além da nomenclatura já utilizada G e P, incluem-se I, R, C, M, A, N, T, E e H, para os genes de VP4, 7, 6, 1, e 3 e as NSP 1 a 5/6 respectivamente (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008a; MATTHIJNSSENS, 2012).

RV é um vírus não envelopado, com partículas poliédricas de aproximadamente 70 nm, podendo medir 100 nm em função de suas espículas (FIG. 01) e triplo capsídeo. Possui ácido nucleico formado por 11 segmentos de RNA de dupla fita, cujo padrão de migração por eletroforese, juntamente às características antigênicas, permite classificá-lo em oito sorogrupos, de A a H (ICTV), (ESTES *et al.*, 2001; PARASHAR *et al.*, 2003).



Figura 01. Partículas de rotavírus observadas à microscopia eletrônica de transmissão, após coloração negativa. Fonte: Dr. W. D. Cubitt, Institute of Child Health, London.

O capsídeo externo é composto pelas proteínas estruturais VP4 e VP7, que juntamente aos seus genes definem o sorotipo/genótipos P (para a glicoproteína VP4) e G (para a proteína sensível à protease VP7). O capsídeo interno é composto exclusivamente de cópias da VP6 (FIG. 02). Até o momento foram descritos 35 e 27 genótipos P e G respectivamente, com cinco principais combinações: P[8]G1, P[8]G3, P[8]G4; P[4]G2 e P[8]G9 (GENTSCH *et al.*, 1996; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008; ZELLER *et al.*, 2010). Porém, genótipos considerados incomuns até pouco tempo como G5, G9 e G12 foram descritos no Brasil (LEITE *et al.*, 1996; ARAÚJO *et al.*, 2001; PIETRUCHINSKI *et al.*, 2006).

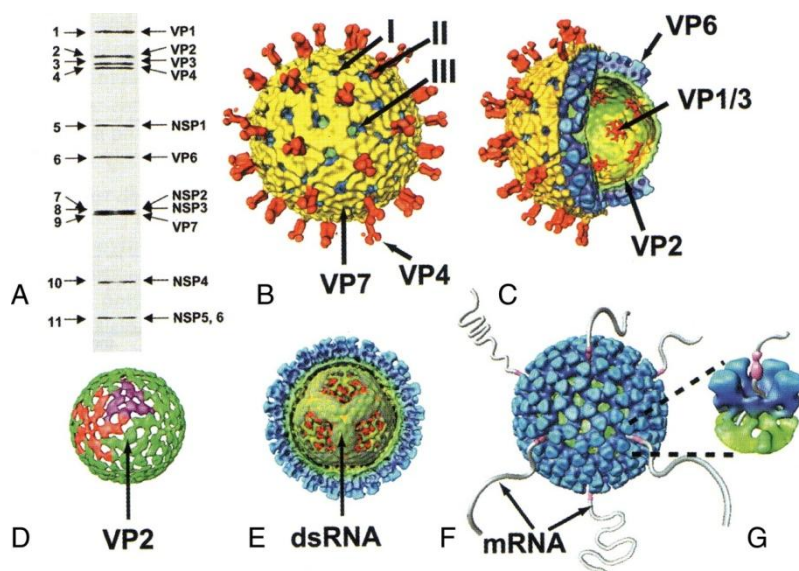


Figura. 02 Organização estrutural dos RV: (A) Gel de poliacrilamida mostrando os 11 segmentos genômicos relacionados ao lado com suas respectivas proteínas. (B) Estruturas de superfície dos RV. (C) Representação das estruturas do capsídeo interno e do core. (D) Organização estrutural dos dímeros de VP2. (E) Representação do RNAfd dos RV. (F) Representação do RNAm nascente. (G) Representação ampliada de um dos canais de classe I. As imagens de B a G são reconstruções a partir de criomicroscopia eletrônica. Fonte: Dr B.V. Venkataram Prasad.

3.1.2 Transmissão aspectos clínicos e epidemiologia

De transmissão fecal-oral, suas partículas podem ser transmitidas por água e alimentos contaminados, assim como por fômites, uma vez que suas partículas são estáveis no meio ambiente. A diarreia por RV apresenta um período de incubação de aproximadamente 2 dias. A doença é caracterizada por vômito e diarreia profusa por 3 a 8 dias, frequentemente ocorrendo febre e dor abdominal. A imunidade após a infecção é incompleta, porém as reinfecções tendem a se desenvolver de forma mais branda (CDC, 2013b).

No Brasil, o RV foi relatado com prevalência variando de 11 a 38% (CARDOSO *et al.*, 1989; LEITE *et al.*, 1996; ORLANDI *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2002). Estudo epidemiológico abrangente, realizado na Alemanha entre 2001 e 2008 mostra uma incidência de RV em crianças menores de dois anos de 200/10.000 (KOCH & WIESE-POSSELT, 2011).

Em Vitória, ES, o genótipo G9 correspondeu a 50% das cepas de RV identificadas em crianças internadas com diarreia (RIBEIRO *et al.*, 2008), sendo que na França, G9 aparece com 27,4% de prevalência entre crianças internadas com diarreia em hospitais universitários entre os anos de 2006 e 2009, sendo menos importante como causa de diarreia apenas que o genótipo G1, que respondeu por 61,7% dos casos (ROUGEMONT *et al.*, 2011). Enquanto no Brasil, com a emergência de G9P[8], a prevalência de G2P[4] caiu de 26% entre 1982 e 1995 para 2% entre 1996 e 2005, voltando a crescer atingindo prevalência de 96% (CARVALHO COSTA *et al.*, 2009). A vigilância dos RV é importante para o acompanhamento das cepas circulantes, substituição de genótipos em surtos sucessivos (MARTINI *et al.*, 2008; PAUL *et al.*, 2008), assim como em função da introdução da vacina monovalente para RV (P[8]G1) pelo Programa Nacional de Imunização, a qual tem atingido seus objetivos na América Latina (DESAI *et al.*, 2011), porém sem o mesmo sucesso na África e Ásia (MATTHIJNSSENS, 2012).

O surgimento de cepas novas ou incomuns de RV em uma comunidade, seja por introdução de cepas animais ou exóticas, seja por rearranjo gênico ou "reassortment" (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008a; PATON, 2012) cujas cepas sejam distintas da cepa vacinal, poderá comprometer a eficácia da vacina. Apesar da possibilidade de proteção heteróloga com relação aos antígenos da VP4 e VP7, a circulação de novas cepas necessita de vigilância permanente (GHOSH *et al.*, 2008).

3.2 Norovírus

3.2.1 Classificação e estrutura da partícula

Os NoV, pertencentes à família *Caliciviridae* juntamente com os sapovírus, representam os calicivírus humanos (CHIBA *et al.*, 2000).

Os genes que codificam sua polimerase e a principal proteína de capsídeo, a VP1, tem sido utilizados para fins de classificação do NoV em genogrupos (PRASAD *et al.*, 2012). Há seis genogrupos distintos de GI a GVI, sendo que

três deles, GI, GII e GIV estão relacionados a infecções em humanos, onde se encontram distribuídos pelo menos 30 genótipos (GLASS *et al.*, 2009; HALL *et al.*, 2011, CDC, 2013c) (FIG. 03).

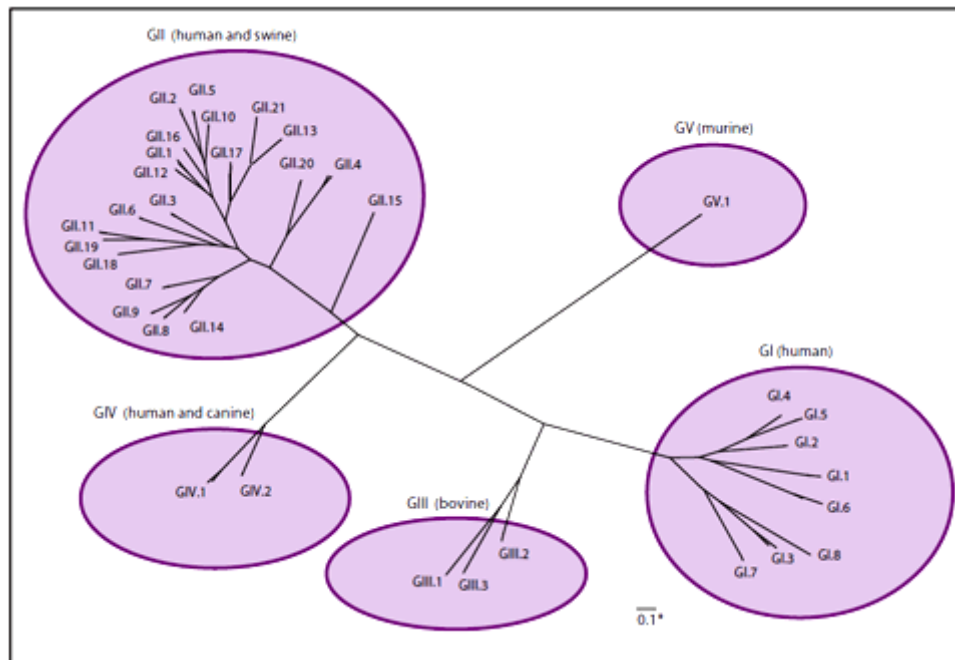


Figura 03. Árvore filogenética dos genogrupos e genótipos de NoV. Fonte: Hall *et al.*, 2011.

São vírus pequenos com 27 a 35 nm de diâmetro, não envelopados (FIG 04), com genoma constituído por RNA de fita simples (RNAs) de polaridade positiva (PRASAD *et al.*, 1994).

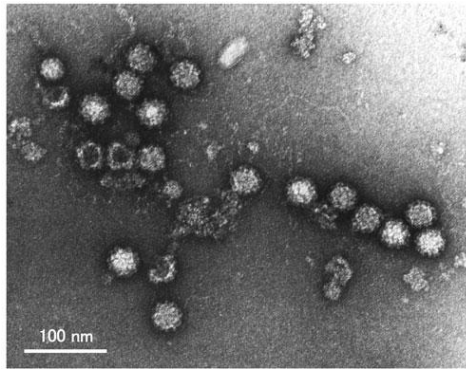


Figura 04. Microscopia eletrônica de partículas de norovírus após coloração negativa, estirpe Chiba407. Fonte: <http://glycoforum.gr.jp>

O genoma dos NoV é composto de três regiões abertas de leitura (ORF) (DONALDSON *et al.*, 2010) (FIG. 05). A ORF1 (aproximadamente 5kb) está localizada nos dois terços iniciais do genoma e codifica uma poliproteína de aproximadamente 200 kDa, que é processada por proteínas virais originando proteínas não estruturais, entre elas a replicase e a RNA polimerase RNA-dependente, essenciais na replicação viral. A ORF2 com 1,8 kb, codifica a principal proteína do capsídeo viral, a proteína viral 1 (VP1), que numa composição de 180 monômeros, forma o capsídeo viral. A VP1 é dividida em dois domínios, o domínio S ("shell") e o domínio P ("protruding"), o qual é subdividido em dois subdomínios P1 e P2, regiões altamente variáveis e alvo de anticorpos neutralizantes. A ORF3 com 0,6 kb, codifica a proteína "minor" do capsídeo viral com 22 kDa, a VP2 (FIG. 5) (DONALDSON *et al.*, 2010).

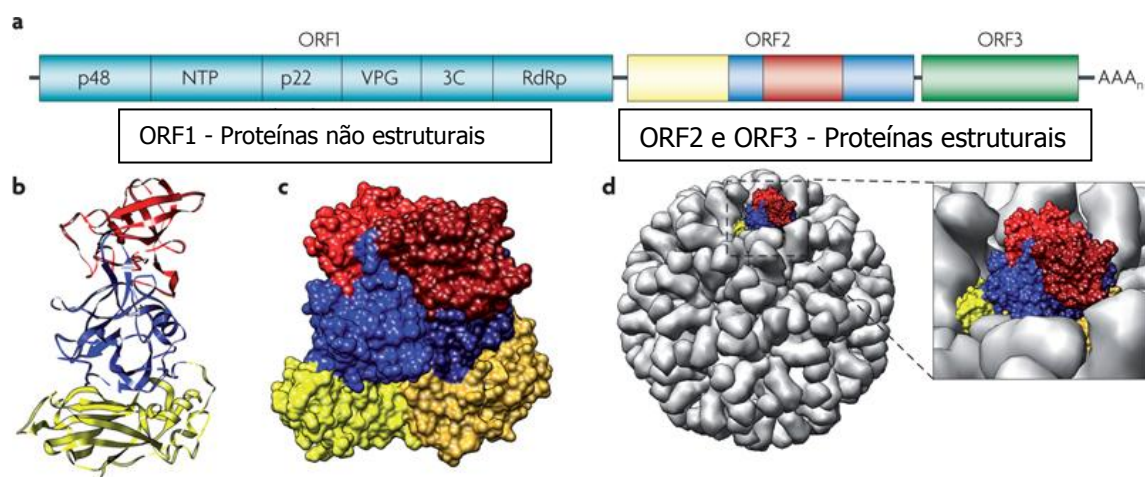


Figura 05. Diagrama com a organização genômica dos norovírus (a) e os domínios da VP1 (b,c,d), coloridos em acordo com o diagrama **a**. Representação do monômero de VP1 (b) e de seu dímero (c). O domínio "shell" em amarelo e o "protruding" em vermelho com seus sub-domínios em azul (b, c, d). Fonte: adaptado de Donaldson *et al.*, 2010.

3.2.2 Transmissão, aspectos clínicos e epidemiologia

A infecção por NoV resulta da ingestão de partículas virais sendo uma das principais doenças transmitidas por água e alimentos contaminados, podendo ainda ser transmitido através de fômites e por aerossóis gerados pelo vômito ou a partir de mãos contaminadas (TURCIOS *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2008; GLASS *et al.*, 2009). Após um período de incubação de 12 a 48 horas, a gastroenterite por NoV é aguda, podendo apresentar vômito como primeiro sintoma, seguido de dor abdominal e diarreia aquosa, porém não apresentando sangue ou muco; as náuseas podem ocorrer por dias (CDC, 2013c).

Os NoV, antes conhecidos como causa mais importante de gastroenterite epidêmica (BLANTON *et al.*, 2004), vêm sendo reconhecidos como causa importante também de gastroenterite esporádica no mundo todo, e acometendo indivíduos de todas as idades (GLASS *et al.*, 2009) e associados à diarreia comunitária e casos de crianças hospitalizadas em 5 e 36% respectivamente (PATEL *et al.*, 2008). Em populações vacinadas para RV, os NoV despontam como principal causa de diarreia (BUCARDO *et al.*, 2011).

A prevalência das infecções causadas pelos NoVs inclusive no Brasil, em pacientes quer sejam ambulatoriais ou hospitalizados, vem sendo descrita a partir de 2004 (GALLIMORE *et al.*, 2004; CASTILHO *et al.*, 2006; VICTORIA *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2008; BARREIRA *et al.*, 2010, ARAGÃO *et al.*, 2011, SIQUEIRA *et al.*, 2013) e num estudo prospectivo de 15 anos os NoV foram responsáveis por aproximadamente 25% dos casos de diarreia (FERREIRA *et al.*, 2012).

3.2.3 Relação dos NoV e HBGA

Desde sua descoberta, ensaios de desafio em seres humanos mostraram que havia indivíduos naturalmente resistentes aos NoV (PARRINO *et al.*, 1977). O fato de ainda não terem sido bem adaptados ao cultivo em sistemas celulares (DUIZER *et al.*, 2004; STRAUB *et al.*, 2007), dificulta a identificação de receptores e o entendimento da resistência e susceptibilidade a estes agentes. A expressão de VP1 recombinante em células eucariontes permite a reconstrução *in vitro* de "virus-like particles" (VLPs), antigênica e morfológicamente idênticas às partículas selvagens (JIANG *et al.*, 1992). Essas VLPs têm sido utilizadas para definir a relação parasita-hospedeiro e as estruturas de receptor e antirreceptor envolvidas (MARIONNEAU *et al.*, 2002; LE PENDU *et al.*, 2006). As moléculas HBGA, tem se mostrado como importantes receptores às diferentes VLPs testadas (MARIONNEAU *et al.*, 2002; HARRINGTON *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2003; NILSSON *et al.*, 2009; RYDELL *et al.*, 2009; KUBOTA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013).

Os HBGA são oligossacarídeos sintetizados numa reação com adição de monossacarídeos aos precursores glicanos dos sistemas ABO e Lewis, via glicosiltransferases, Fut2 e Fut3 (LE PENDU *et al.*, 2006) (FIG. 06). A enzima Fut2 adiciona uma fucose na ligação α 1,2 da galactose do precursor, gerando o antígeno H enquanto a enzima Fut3 adiciona um resíduo de fucose à ligação α 1,4 (ou 1,3) no N-acetilglucosamina do precursor gerando o antígeno Lewis a (Le^a) ou o antígeno Lewis b (Le^b) quando combinado com um resíduo de α 1,2 fucose (LE PENDU *et al.*, 2006). As enzimas A e B catalisam a adição de uma N-

acetilgalactosamina ou uma galactose ao antígeno H, gerando o antígeno A ou B respectivamente. Os genes *FUT2*, *FUT3* e *ABO* possuem os alelos funcionais codificando as enzimas Fut2, Fut3, A e B respectivamente. Os genes *FUT2*, *FUT3* e *ABO* também se apresentam como alelos nulos na população humana, que são transcritos em enzimas inativas ou com atividade diminuída. Indivíduos que apresentam o antígeno H em seu tecido epitelial e secreções são considerados secretores (*Se*) (LE PENDU *et al.*, 2006). Entretanto indivíduos com os dois alelos *Fut2* nulos, não sintetizam os antígenos H, A, B ou Le^b e são denominados não-secretores (*se*). A principal mutação inativadora do *Fut2* é a G428A que em homozigose inativa completamente a atividade enzimática (THORVEN *et al.*, 2005), porém este gene apresenta grande polimorfismo na população humana (FERRER-ADMETLLA *et al.*, 2009). Similarmente, indivíduos homozigotos para os dois alelos *Fut3* nulos, não produzem os antígenos Le^a e Le^b, enquanto homozigotos nulos para o gene *ABO* não sintetizam os antígenos A e B, sendo, portanto, indivíduos tipo O (MARIONNEAU *et al.*, 2001; LE PENDU *et al.*, 2006).

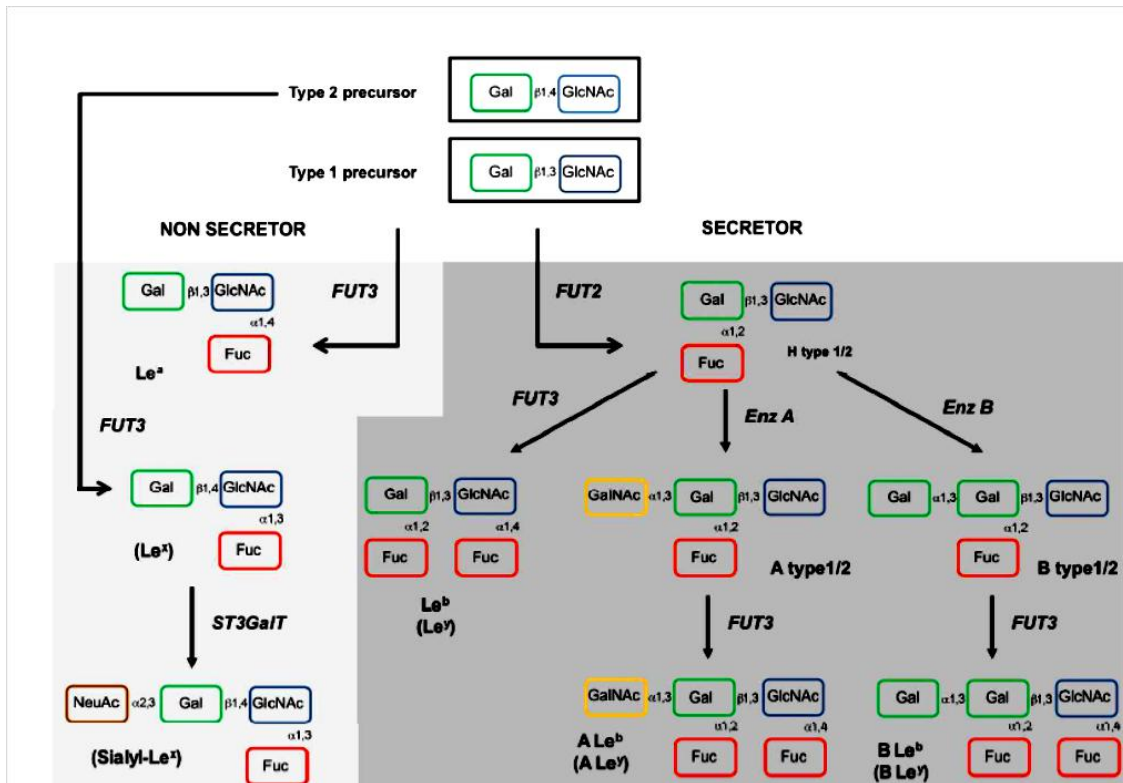


Figura 06. Síntese dos antígenos histo-sanguíneos ABH e Lewis a partir do precursor Tipo 1. Fonte: gentilmente cedido pelo Dr. Jacques Le Pendu, INSERM, Nantes, França.

Aproximadamente 80% da população mundial apresenta o fenótipo *Se*, sendo considerados susceptíveis à infecção pela maioria das estirpes de NoV, com variações em função do fenótipo ABO e da habilidade da partícula viral em adsorver aos antígenos A, B, H ou Le^b (LE PENDU *et al.*, 2006). O restante da população (20%) com fenótipo *se* são considerados naturalmente resistentes para a grande maioria dos NoV (LINDESMITH *et al.*, 2003; HUTSON *et al.*, 2005; THORVEN *et al.*, 2005; TAN *et al.*, 2008).

Entretanto, tem sido descritas VLPs de NoV dos genogrupos GI e GII, capazes de se ligar aos antígenos Le^a e Le^x, presentes principalmente em indivíduos *se*, portanto com indivíduos não secretores tendo sido esporadicamente descritos susceptíveis à infecção por NoV (HUANG *et al.*, 2005; BUCARDO *et al.*, 2009, NORDGREN *et al.*, 2010; ROUGEMONT *et al.*, 2011; KUBOTA *et al.*, 2012).

Assim, os NoV tem apresentado ampla capacidade de ligação aos diferentes antígenos A/B, H, Le^a, Le^b, não sendo a mutação sem sentido G428A, absoluta

para promover a resistência (CARLSSON *et al.*, 2009). Sendo a caracterização das moléculas que atuam como receptores e/ou co-receptores aos NoV, de fundamental importância para o desenvolvimento de sistemas de prevenção (NORDGREN *et al.*, 2013, ZHANG *et al.*, 2013).

Estudos com os povos africanos sobre sua susceptibilidade aos NoV em função de seu perfil fenotípico e genotípico para HBGA, mostra perfil semelhante ao das populações dos outros continentes para as mutações do gene *Fut2* e atividade da fucosil-transferase 2 (PATNAIK *et al.*, 2011). Apenas uma mutação silenciosa na posição 40 os diferencia dos demais povos (PATNAIK *et al.*, 2011).

3.3 Adenovírus

3.3.1 Classificação e estrutura da partícula

Os HAdV entéricos, relacionados à diarreia aguda infantil, fazem parte do gênero *Mastadenovirus*, família *Adenoviridae* constituída por sete espécies (A-G) e 52 sorotipos (RUX e BURNETT, 2004; KING *et al.*, 2011). Apesar desse número oficial de tipos para o ICTV, muitos outros tipos novos tem sido descritos e caracterizados, sendo propostos como novos tipos HAdV-D65 e HAdV-D67 (MATSUSHIMA *et al.*, 2012; MATSUSHIMA *et al.*, 2013).

Para determinação do sorotipo, nas últimas décadas se utilizou de reações antígeno-anticorpo com soros específicos (HARSI *et al.*, 1995). A caracterização das espécies e tipos tem sido realizadas pelas técnicas de Análise dos Tamanhos dos Fragmentos após Restrição por endonucleases (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) dos produtos de PCR e por sequenciamento genético do gene hexon (ALLARD *et al.*, 2001; KOVA'CS *et al.*, 2004; MADISCH *et al.*, 2005).

Mais recentemente tem sido proposta a revisão das técnicas de classificação, incluindo o sequenciamento total dos genes hexon, penton e fibra (SETO *et al.*, 2011; MATSUSHIMA *et al.*, 2012).

São vírus icosaédricos, não envelopados, com genoma constituído por DNA de dupla fita (DNAdf) (FIG. 07) (RUX *et al.*, 2004). O genoma apresenta 34.100

pb e codifica 36 proteínas, das quais 13 são estruturais (RUSSEL *et al.*, 2009) (FIG. 08). A principal proteína do capsídeo é a proteína hexon, porém o virion dos HAdV apresenta outras 10 proteínas estruturais (RUSSEL *et al.*, 2009).

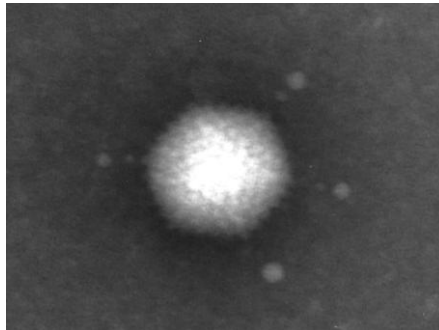


Figura 07. Microscopia eletrônica de partícula de HAdV, após coloração negativa. Fonte: <http://www.med.unc.edu/microscopy/services/electron-microscopy> e <http://cronodon.com/BioTech/Adenovirus.html>

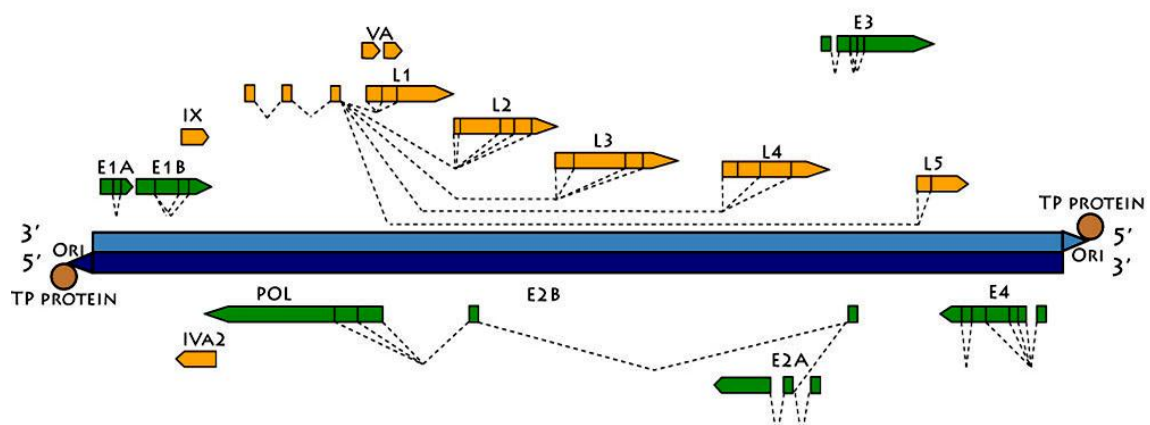


Figura 08. Organização genômica dos HAdV e suas múltiplas ORFs. http://education.expasy.org/images/adenoviridae_genome.jpg

A proteína hexon é composta de 924 resíduos de aminoácidos e apresenta-se no virion como 240 cópias, sendo 12 trímeros em cada uma das 20 faces (FIG.09). A região que codifica a alça "loop 1" é característica para cada tipo. O gene do hexon apresenta um total de 2772 pb, sendo mais utilizadas para fins de diagnóstico e sequenciamento a região entre a posição 21 e 322 (ALLARD *et*

al., 2001; KOVA´CS *et al.*, 2004; MADISCH *et al.*, 2005). Outras proteínas estruturais compõem o capsídeo como a penton e a fibra, além das proteínas secundárias associadas a elas, como a proteína VI, VIII e IX (RUSSEL *et al.*, 2009). Nos 12 vértices do icosaedro, ocorrem os pentâmeros de proteína penton e sobre eles, os trímeros da proteína fiber que apresentam três regiões: cauda, eixo e botão (RUSSEL *et al.*, 2009).

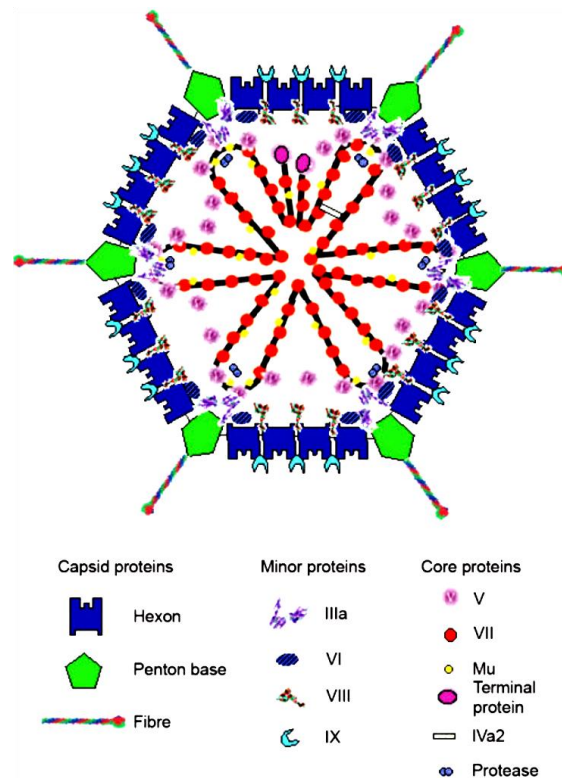


Figura 09. Estrutura organizacional das proteínas estruturais na partícula de HAdV. Fonte: Russel *et al.*, 2009.

3.3.2 Transmissão, aspectos clínicos e epidemiologia

De transmissão fecal-oral e com partículas altamente resistentes no meio ambiente, são transmitidos também por água contaminada e fômites. A gastroenterite por HAdV se desenvolve após um período de incubação de 8 a 10 dias, sendo a diarreia o principal sintoma. As fezes apresentam-se aquosas mas não sanguinolentas durante 7 a 8 dias. Em até 80% dos casos, ocorre vômito com 2 dias de duração e febre pode ocorrer entre metade e 90% dos casos, durando de 2 a 3 dias (RICHMOND *et al.*, 1979; BRANDT *et al.*, 1985).

A espécie F, associada às gastroenterites, contem os tipos HAdV-F40 e HAdV-F41, embora, alguns outros tipos também tenham sido descritos em infecções intestinais (HAdV-A12, HAdV-A31, HAdV-B3, HAdV-C2, HAdV-C5, HAdV-G52, HAdV-D8, HAdV-D65, HAdV-D67,) (HIERHOLZER *et al.*, 1992; CLARK & McKENDRICK, 2004; LI *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2007; MATSUSHIMA *et al.*, 2013).

Os demais HAdV estão associados às doenças como ceratoconjuntivite (HAdV-D8, HAdV-D19 e HAdV-D37) (ROBINSON *et al.*, 2008; ROBINSON *et al.*, 2009), infecções respiratórias agudas (HAdV-B3, HAdV-E4, HAdV-B7, HAdV-B14, HAdV-B21) (DINGLE *et al.*, 1968) e até falência cardiopulmonar em crianças e obesidade (MISTCHENKO *et al.*, 1998).

Estudos no Brasil descrevem frequências de HAdV variando de 2% a 11%, sem que fosse realizada a discriminação da espécie entérica (HÁRSI *et al.*, 1995; SOARES *et al.*, 2002; MAGALHÃES *et al.*, 2007; PEREIRA-FILHO *et al.*, 2007). Estudos com amostras de diarreia comunitária, realizado nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói, estado do Rio de Janeiro, em Londrina, estado do Paraná, e em Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, encontraram prevalência de 4,8% de HAdV (SOARES *et al.*, 2002). Na periferia de Salvador estado da Bahia, foi encontrado prevalência de 2.8% (PEREIRA-FILHO *et al.*, 2007).

Em crianças hospitalizadas no estado de São Paulo, foi encontrada prevalência de HAdV de 10% e 11,4% em crianças com diarreia e num grupo controle, respectivamente (HÁRSI *et al.*, 1995). No estado de Rondônia foi encontrada uma prevalência de 6,4% em crianças sintomáticas e 1,7% assintomáticas (MAGALHÃES *et al.*, 2007). Semelhantemente, frequências inferiores a 4% foram descritas em crianças hospitalizadas em Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul (ANDREASI *et al.*, 2008).

Em população africana no Norte de Gana, foi detectada frequência de 27,6% de HAdV entre crianças sintomáticas e de 31.5% entre os assintomáticos (REITHER *et al.*, 2007).

A proporção da espécie HAdV-F sobre as demais tem revelado que a espécie considerada entérica HAdV-F, representam entre um a dois terços do total de

espécies encontradas em estudos com crianças hospitalizadas (HÁRSI *et al.*, 1995; SOARES *et al.*, 2002; PEREIRA-FILHO *et al.*, 2007).

3.4 Astrovírus

3.4.1 Classificação e estrutura da partícula

Pertencem à família *Astroviridae* e ao gênero *Mamastrovirus* com oito sorotipos descritos que apresentam boa correlação com oito genótipos (JEONG *et al.*, 2012).

Os AstV apresentam partículas com simetria icosaédrica não envelopadas, de 33 nm de diâmetro, e pequenas espículas de 5 nm, dispostas radialmente em sua superfície (DONG *et al.*, 2011) (FIG. 10 e 11).

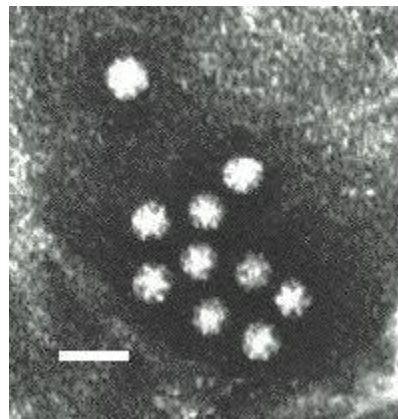


Figura 10: Microscopia eletrônica de partículas de AstV após coloração negativa.

Fonte: http://www.virology.net/big_virology/BVRNAastro.html

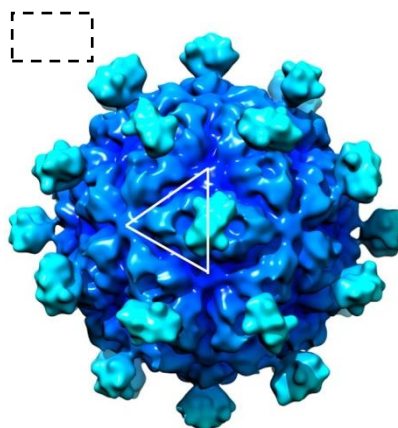


Figura 11. Modelo estrutural do capsídeo do AstV, evidenciando suas espículas. Fonte: Adaptado de Dong *et al.*, 2011.

O genoma do HAstV é composto por um segmento de RNAs, polaridade positiva, com aproximadamente 6,8 Kb e está organizado em três regiões abertas de leitura (ORF1a, ORF1b e ORF2) (JIANG *et al.*, 1993; WILLCOCKS *et al.*, 1994) (FIG. 12).

Suas proteínas estruturais são codificadas pela ORF2, localizada na porção C-terminal do RNA genômico e também por um RNA sub-genômico produzido durante o ciclo de replicação viral contendo 2,4Kb. As proteínas estruturais presentes nas partículas de HAstV são denominadas em função de seus pesos em KDa, VP32, VP29 e VP26 respectivamente. As três proteínas estruturais são obtidas diretamente de digestão da proteína precursora p87, que é utilizada para fins de detecção por RT-PCR utilizando os *primers* universais Mon 244-245 e Mon 269/270 descritos por Noel *et al.* (1995), assim como para a classificação em sorotipos e genótipos (NOEL *et al.*, 1995).

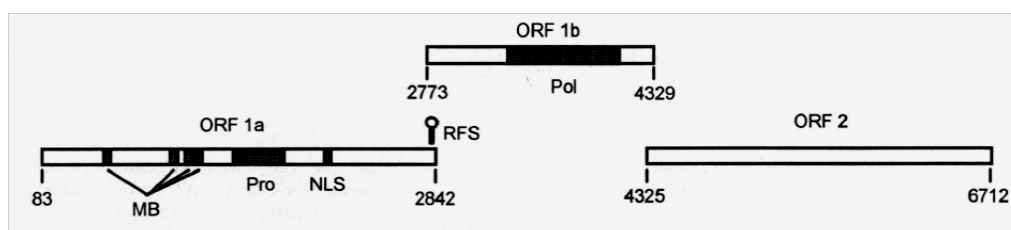


Figura 12. Organização genômica dos AstV, com suas três ORFs (ORF1a , ORF1b e ORF2) Fonte: Jiang *et al.*, 1993.

A VP26 apresenta-se como a principal proteína presente no capsídeo e é antígeno neutralizável por anticorpos do hospedeiro (ROYUELA e FAUQUIER, 2010; DONG *et al.*, 2011).

3.4.2 Transmissão, aspectos clínicos e epidemiologia

Assim como os demais vírus entéricos, os AstV são transmitidos a partir de sua eliminação nas fezes de pessoas infectadas e o contato pessoa-a-pessoa parece ser a principal forma de transmissão. Os sintomas ocorrem após dois a três dias de incubação e a diarreia costuma durar igual período. Apesar das semelhanças com os demais, as infecções pelo AstV são clinicamente mais brandas (diarreia, vômito, febre) do que as infecções com RV, NoV ou HAdV. Ocasionalmente estão associados a surtos de gastroenterite (JEONG *et al.*, 2012).

Os AstV humanos (HAstV) são reconhecidos no mundo inteiro como importante causa de gastroenterite, principalmente na população infantil (CLARK & MCKENDRICK, 2004). Dentre os oito sorotipos descritos, o sorotipo 1 é o mais prevalente no mundo todo (JEONG *et al.* 2012). No Brasil, foi relatado em frequência de 4,3% em Goiás e 5,4% no Pará respectivamente (SILVA *et al.*, 2009; GABBAY *et al.*, 2007) e de 14% em crianças hospitalizadas no Rio de Janeiro (VICTORIA *et al.*, 2007).

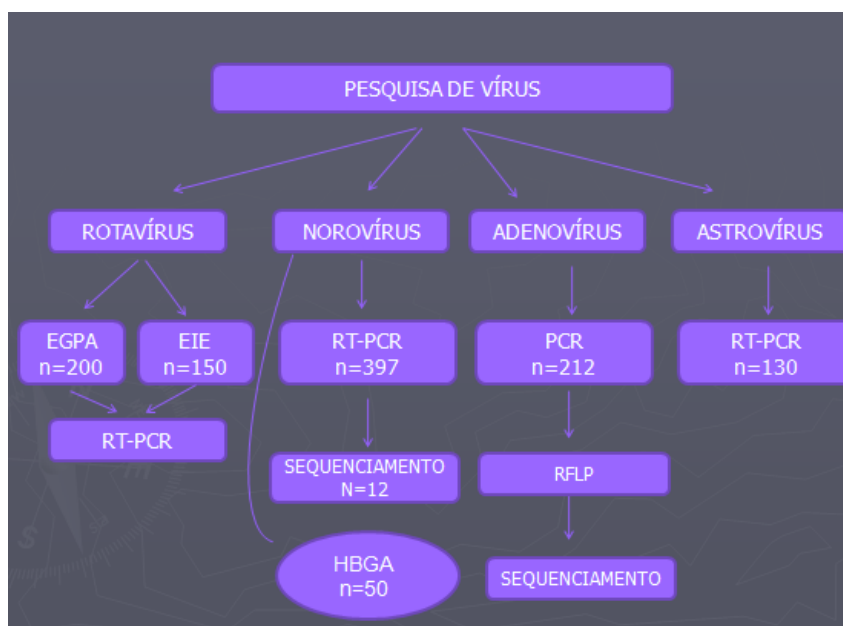
3.5 Apresentação do estudo desenvolvido

Considerando as precárias condições higiênico-sanitárias das Comunidades Quilombolas, e a ampla susceptibilidade esperada aos patógenos entéricos de natureza viral, assim como demonstram estudos em outras regiões do planeta em condições semelhantes (MOY *et al.*, 1991; MANUN'EBO *et al.*, 1994; MØLBAK *et al.*, 2001; NATCHU e BHATNAGAR, 2013), foram contemplados neste trabalho, a pesquisa de RV, HAdV, NoV e AstV.

Foram estudados os casos de diarreia comunitária e esperava-se traçar o perfil dos patógenos que acometem as crianças de até onze anos. Para isso, entre os

meses de agosto de 2007 e maio de 2010, foram coletadas 570 amostras fecais, sendo 133 de crianças sintomáticas.

Todas as amostras das crianças sintomáticas foram testadas para os 4 vírus (Fluxograma 1). Para cada vírus se estabeleceu uma proporção entre sintomáticos e assintomáticos a serem testados, variando de 1:0 (Astv), até 1:2(NoV), como são apresentados nos dois artigos científicos escritos a partir dos resultados positivos para NoV e HAdV obtidos.



Fluxograma 01. Apresentação de todas as técnicas realizadas para a detecção e caracterização molecular dos vírus pesquisados.

No intuito de avaliar a relação entre os genótipos de NoV detectados e o perfil de HBGA das crianças infectadas, foram realizadas as determinações fenotípicas e genotípicas a partir de saliva e sangue, para Fut2 e Fut3 de uma subpopulação negra Quilombola, incluindo os infectados por NoV (VICENTINI *et al.*, 2013).

Foi realizada ainda uma análise filogenética para avaliar a proximidade das cepas circulantes localmente, com aquelas encontradas no Brasil (MARTINI *et al.*, 2008) e especialmente em populações de etnia semelhante como Burkina-Faso (NORDGREN *et al.*, 2013), Nigéria (ADAH *et al.*, 2001), Botswana (BASU *et al.*, 2003), Camarões (ESONA *et al.*, 2004), Gana (ARMAH *et al.*, 2001), em

países de outros continentes, como a Itália (DE GRAZIA *et al.*, 2004; MÉDICI *et al.*, 2008), Espanha (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2008), França (ROUGEMONT *et al.*, 2011), Bangladesh (ALBERT *et al.*, 1999; PAUL *et al.*, 2008), Índia (DAS *et al.*, 1994), Estados Unidos (GENTSCH *et al.*, 1996).

4 METODOLOGIA

4.1 POPULAÇÃO

A população consistiu em crianças de até 11 anos de idade residentes em 24 das 30 Comunidades Quilombolas do Território Sapê do Norte, inseridas nos municípios São Mateus e Conceição da Barra, norte do Espírito Santo (FIG 13).

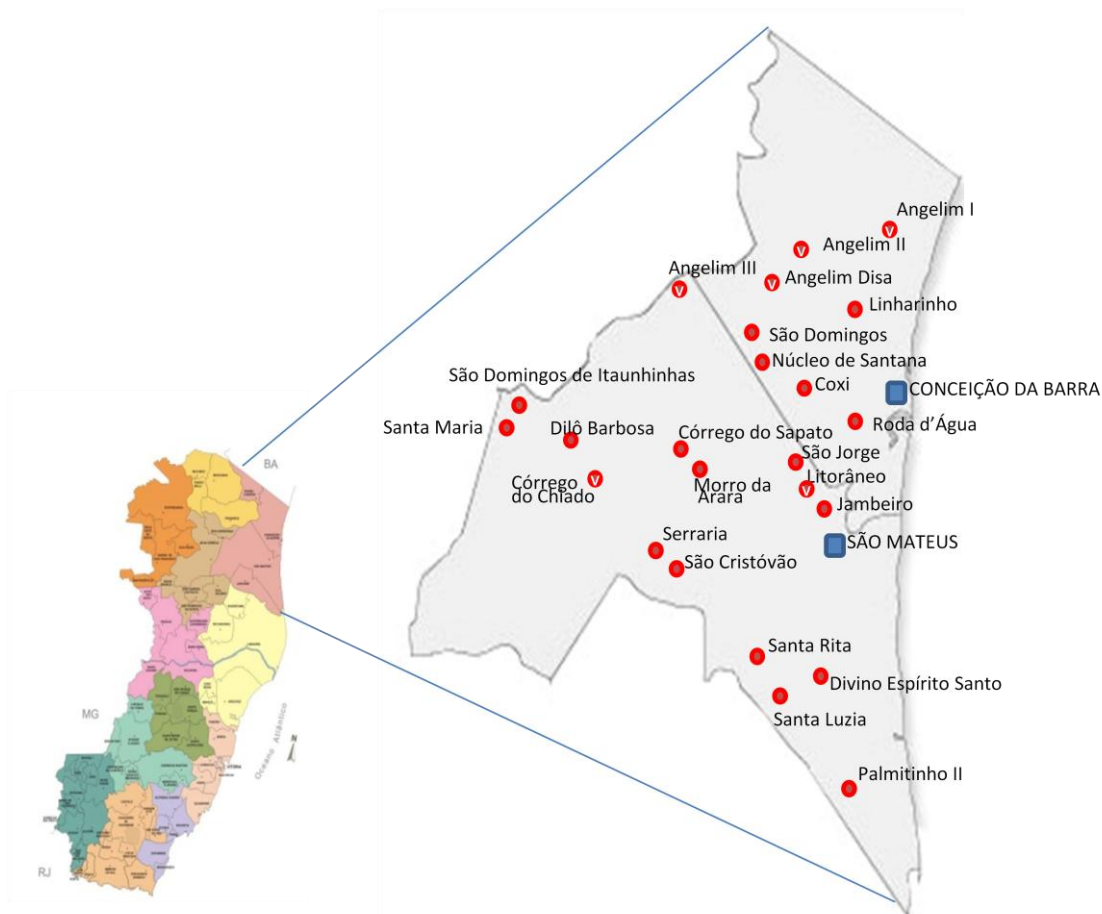


Figura 13. Mapa do Território Sapê do Norte, contemplando as comunidades pertencentes aos municípios de São Mateus e Conceição da Barra que fizeram parte deste estudo. Fonte: Incra e UFES.

4.2 ESTRATÉGIAS DE COLETA DE ESPÉCIMES BIOLÓGICOS

4.2.1 Municípios parceiros

Este trabalho contou com as parcerias das Secretarias Municipais de Saúde de São Mateus e de Conceição da Barra estabelecidas através de termo de anuência pelos respectivos Secretários municipais de Saúde. As Coordenações das Unidades Básicas de Saúde referência das comunidades quilombolas ofereceram apoio técnico e logístico ao trabalho.

4.2.2 A amostra fecal

A amostra caracterizou-se por uma porção de fezes obtida de criança de origem quilombola com ou sem diarreia. Foi definido como diarreia, três ou mais evacuações em um período de 24 horas. Para crianças em aleitamento materno exclusivo, com padrão de evacuação de várias vezes ao dia, foram considerados como episódio de diarreia, aqueles casos relatados com preocupação pela mãe sobre o aumento do fluxo intestinal.

4.2.3 Amostragem

A coleta de material biológico só foi possível graças ao apoio das Coordenações de Estratégia de Saúde da Família - ESF, Enfermeiros Chefes das Unidades Básicas de Saúde - UBS, Técnicos e principalmente as lideranças comunitárias ligadas aos movimentos quilombola e negro. Assim, todas as famílias foram contatadas e muitas casas visitadas.

No primeiro contato com as comunidades, foram agendadas reuniões em cada uma das comunidades, onde foram convidados pais e responsáveis pelas crianças de até cinco anos de idade, para conhecer a proposta. Diante da aceitação por parte dos membros das comunidades e dos técnicos, estabeleceu-se cronograma de visitas para coleta de fezes.

Os técnicos das UBS foram preparados para atender as mães ou responsáveis por crianças com diarreia e para a coleta de fezes, identificação das crianças e

das amostras, acondicionamento e envio para o Laboratório de Microbiologia do campus da UFES no município de São Mateus.

Os espécimes clínicos foram obtidos após esclarecimento dos objetivos da pesquisa e da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2) pelo responsável pelas crianças.

4.2.4 Coleta de espécime fecal

Foram coletadas 574 amostras de fezes entre agosto de 2006 e maio de 2010. Entre as amostras de crianças sintomáticas, somaram-se 133. Também foram coletadas amostras fecais de crianças saudáveis para fins de controle. As fezes, acondicionadas em coletores universais e refrigeradas em caixas térmicas com gelo reciclável, foram encaminhadas ao laboratório de Microbiologia do campus São Mateus da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUNES), onde foram fracionadas e encaminhadas ao Laboratório de Gastroenterite Infecciosa, Departamento de Patologia – UFES, para: (i) detecção de RV através da pesquisa de RNAdf pela técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA) e por Ensaio imuno-enzimático (EIE) para a detecção de antígenos virais; (ii) detecção e genotipagem de NoV através de RT-PCR e; (iii) detecção de HAdV por PCR e Nested-PCR e determinação da espécie F através de RFLP. Amostras positivas para NoV e HAdV foram seqüenciadas no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental da FIOCRUZ, sob a Coordenação da Dra. Marize Pereira Miagostovich e orientação de Dr. José Paulo Gagliardi Leite.

4.2.5 Coleta de sangue

De 12 crianças com e sem diarreia que foram positivas para NoV, 5 mL de sangue foi obtido em tubo *vacutainer* contendo anticoagulante EDTA. Um volume de sangue 10 mL foi também obtido de 38 indivíduos quilombolas adultos. As amostras de sangue foram utilizadas para determinação do fenótipo e genótipo para HBGA. As amostras de sangue foram transportadas ao Laboratório de Microbiologia da UFES, São Mateus, onde foram realizadas as

caracterizações fenotípicas. A caracterização genotípica foi realizada no Laboratório de Gastroenterite Infecciosa, Departamento de Patologia – UFES e no Laboratório de Glicovirologia, INSERM, Université de Nantes, em Nantes, França.

4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS FECAIS

4.3.1 Preparo da suspensão fecal

Suspensão das fezes foi realizada a 10% em tampão Tris/Cálcio 0,01M, clarificada por centrifugação e mantida a -20°C até extração do ácido nucléico viral.

4.3.2 Extração de ácido nucléico viral

Ácido nucléico foi extraído através de metodologia utilizando isotiocianato de guanidida-EDTA e partículas de sílica, conforme descrito por Boom *et al.* (1990). O ácido nucleico extraído foi estocado a -18°C até a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) ou reações de amplificação de ácido nucléico viral. Alternativamente, QIAmp® Viral (Qiagen) foi utilizado para a extração de RNA viral, conforme instruções do fabricante.

4.3.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para detecção de RV, NoV e AstV por PCR, DNA complementar (cDNA) ao RNA viral foi sintetizado utilizando-se iniciador randômico pd(N)6® (Amersham Bioscience, UK) após desnaturação com dimetilsulfóxido (DMSO) a 97°C por 7 min, numa mistura de reação contendo 1,25 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 2,5 unidades de transcriptase reversa Superscript II™ (Invitrogen), à 42°C por 1 hora (BEURET *et al.*, 2002). O cDNA foi armazenado em freezer -20C e usado posteriormente para as reações respectivas de PCR.

4.4 DETECÇÃO VIRAL E ANÁLISE MOLECULAR

As técnicas realizadas a partir das amostras fecais estão sistematizadas no Fluxograma 01.

4.4.1 Rotavírus

4.4.1.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA)

EGPA para detecção do RNAdf viral e determinação do grupo do RV (PEREIRA *et al.*, 1983) foi realizado em gel descontínuo, constituído de duas fases, uma concentradora a 3,5% e uma separadora a 7%. A corrida eletroforética foi realizada a uma tensão constante de 120 V e corrente elétrica inicial de 15 mA por 2:30 horas. O gel foi corado pelo método de impregnação pela prata (HERING *et al.*, 1982), brevemente descrito a seguir: o gel removido das placas da cuba de eletroforese foi fixado em solução aquosa de ácido acético a 0,5% e etanol a 10%, permanecendo sob agitação por 30 min. Fixado, o gel foi transferido para uma solução aquosa de nitrato de prata a 0,11 M, e após 30 min, foi lavado rapidamente por três vezes com água destilada e então revelado em solução de hidróxido de sódio a 3%, acrescido de formalina a 0,2 M. O gel foi mantido nessa solução por um período de 5 a 10 min, até o aparecimento nítido das bandas de ácido nucléico do controle positivo (amostra sabidamente positiva para o RNAdf de RV do grupo A), assim como das amostras positivas. A revelação foi interrompida pela transferência do gel para uma solução de ácido acético a 5%, observado em transiluminador MiniBis Pro[®] (DNR Bio-Imaging Systems) quando então foi fotografado para o arquivamento dos resultados.

4.4.1.2 Ensaio imuno-enzimático (EIE - Elisa)

O EIE foi realizado em microplacas de 96 poços, pré-sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para a VP6, dos RV do grupo A. A técnica de elisa de captura foi realizada com kit comercial RIDASCREEN[®] Rotavirus (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha), seguindo orientações do fabricante e utilizando soluções fornecidas pelo fabricante desde a suspensão fecal.

4.4.1.3 Reação em Cadeia pela Polimerase

4.4.1.3.1 Detecção e tipagem G e P de rotavírus.

RT-PCR com iniciadores específicos para amplificação de seqüência consenso de G (9con1/9cpn2) e de P (4con2/4con3) foram realizadas separadamente com 2,5 µl do cDNA, num volume final de reação de 25 µl constituído por 1,25 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 unidades de Platinum Taq DNA polimerase™ (Invitrogen) e tampão de reação 1x. Iniciadores consenso e específicos para genotipagem foram descritos por Gentsch *et al.* (1992) e Das *et al.* (1994) com modificações introduzidas por Leite *et al.* (1996). Para a determinação dos tipos, nested-PCR com *pool* contendo 10 pmol de cada iniciador para determinação dos tipos G1-G5 e G8 e G10 ou P[4], P[9], P[8] e P[6] foram utilizados em 25 µl de misturas de reação respectivas para G e P, contendo: 1 µl do produto de reação da PCR, 2,0 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 unidades de Taq DNA pol e tampão de reação 1x. Os produtos da PCR e Nested-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado em solução de brometo de etídio a 0,5 mg/ml e observados conforme anteriormente descrito e comparados com padrão de peso molecular de 123 pb.

4.4.2 Adenovírus

4.4.2.1 Reação em Cadeia pela Polimerase

A partir do ácido nucléico extraído (item III.5.1.1), foi realizada reação de PCR seguida por nested-PCR para caracterização do gênero HAdV utilizando os pares de iniciadores Hex1deg/Hex2deg e Nehex3deg/Nehex4deg, gerando fragmento de 301 pb e 171 pb, descritos por Allard *et al.* (2001) e por Pring-Akerblon *et al.* (1999), respectivamente (Quadro 1).

As reações de amplificação foram realizadas em etapa única com 25 µl de reação, contendo 50 mM de KCl, 10mM de Tris-HCl (pH 9,0), 3 mM de MgCl₂, 0,1% de Triton X-100, 100 µM de cada deoxinucleosídeo, 0,5µM de cada primer e 1 U de Taq DNA polimerase. Os ciclos de reação foram assim executados: 3

min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30s e 72°C por 1 min. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e observados conforme previamente descritos.

Quadro 1. Iniciadores utilizados nas reações de PCR para adenovírus, conforme descrito por Allard *et al.* (2001).

Iniciadores	Sequência *5'-3'	Fragmento (pb)
Hex1deg	GCC SCA RTG GKC WTA CAT GCA CAT C	301
Hex2deg	CAG CAC SCC ICG RAT GTC AAA	
Nehex3deg	GCC CGY GCM ACI GAI ACS TAC TTC	171
Nehex4deg	CCY ACR GCC AGI GTR WAI CGM RCY TTG TA	

* S= C/G; R=A/G; K=G/T; W=A/T; I=Inosina

4.4.2.2 Determinação da espécie por RFLP

Amostras que foram positivas na primeira PCR foram usadas na reação RFLP, conforme descrito por Allard *et al.* (2001), com modificações: em 2-4 µL de DNA amplificado (fragmento de 301 pb) foram adicionados 8 µL de água livre de DNase e RNase, 3 µL de solução tampão 10x Bgl II (1 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM β-mercaptoetanol) (Bernard *et al.*, 1994) e 5 Uds da enzima de restrição *SaI* e incubado a 37°C *overnight*. Após o período de incubação foi realizada eletroforese em gel de agarose 2% e observado conforme anteriormente descrito.

4.4.2.3 Determinação da espécie e tipo pelo sequenciamento parcial do gene hexon

A purificação dos produtos de PCR das amostras positivas para HAdV foi realizada com o kit QIAquick[®] kit (Qiagen). O sequenciamento genético foi realizado utilizando-se kit comercial BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA). A eletroforese foi realizada no sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) pertencente à Plataforma PDTIS de sequenciamento da Fiocruz.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas usando *BioEdit Sequence Alignment Editor*, depositadas no GenBank *database* e comparadas com sequências disponíveis, incluindo sequências protótipos de cada espécie e tipo. Árvores filogenéticas foram construída usando método *Neighbor-joining* no programa MEGA versão 5.1 e a distância genética foi calculada com modelo Kimura 2 parâmetros, usando 2000 pseudo-réplicas.

4.4.3 Norovírus

Os NoVs foram detectados pela técnica de RT-PCR pela pesquisa do seu gene de RNA polimerase-RNA dependente. Foram utilizados os pares de iniciadores MON 431/433 e MON 432/434 (BUERET *et al.* 2002) (Quadro 2). Esse conjunto de iniciadores é efetivo para a amplificação de acima de 90% das amostras de NoV pertencentes aos genogrupos I e II (BLANTON *et al.* 2006) e foram utilizados seguindo o protocolo proposto por Victoria *et al.* (2007), como segue: 10 µl do cDNA foi adicionado a um volume de 25 µl contendo 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 5 pmol de cada iniciador e 1 unidade de Taq Polimerase (Invitrogen). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 s, 50°C por 1 min e 72°C por 30s, seguido de extensão final a 72°C por 7 min. O produto foi mantido a 10°C. O produto da amplificação foi revelado por eletroforese em gel de agarose como descrito anteriormente. A determinação do genogrupo foi realizada usando 10 µl de cDNA das amostras positivas para NoVs, em duas misturas de reação contendo um par de iniciadores para GI (SRI-1/SRI-2),

conforme descrito por Bueret *et al.* (2002) e para GII (MON381/MON383), específicos para o gene do capsídeo (região C) (Quadro 2).

Quadro 02. Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados no PCR e sequenciamento dos norovírus.

Iniciadores	Sequencia 5' to 3'	ORF/ Região	Posição	Produto
MON 431	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	ORF1/B	5093	213 pb
MON 433	GAA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	ORF1/B	5305	
MON 432	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	ORF1/B	5093	213 pb
MON 434	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	ORF1/B	5305	
GI SRI 2	AAA TGA TGA TGG CGT CTA AG	ORF2/C	5344	222 pb
GI SRI 3	AAA AYR TCA CCG GGK GTA T	ORF2/C	5566	
GII MON381	CCAGAATGTACAATGGTTATGC	ORF2/C	5362	322 pb
GII MON383	CAAGAGACTGTGAAGACATCATC	ORF2/C	5683	
GI Cap B1	TAT GTT GAC CCT GAT AC	ORF2/D	6738	177 bp
GI Cap B2	TAT GTI GAY CCW GAC AC	ORF2/D	6738	
GI Cap A	GGC WGT TCC CAC AGG CTT	ORF2/D	6914	
GII Cap D1	TGT CTR STC CCC CAG GAA TG	ORF2/D	6432	253 bp
GII Cap D3	TGY CTY ITI CCH CAR GAA TGG	ORF2/D	6432	
GII Cap C	C CCT TYC CAK WTC CCA YGG	ORF2/D	6684	
GI G1SK F	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA	ORF2/C	5342	329 bp
GI G1SK R	CCA ACC CAR CCA TTR TAC T	ORF2/C	5671	
GII G2SK F	CNT GGG AGG GCG ATC GCA A	ORF2/C	5058	343 bp
GII G2SK R	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT	ORF2/C	5401	

4.4.4 Determinação do genótipo de norovírus

Para a caracterização do genótipo de NoV foi realizada PCR usando iniciadores para ORF-2 (região D do capsídeo viral) (VINJÉ *et al.*, 2004) (Quadro 02). As amostras de DNA produto da amplificação, foram purificadas para serem sequenciadas. A purificação foi realizada com kit QIAquick (Quiagen). Foram adicionados cinco volumes de Tampão PB a um volume de amostra e

homogeneizado. A amostra foi colocada em coluna spin QIAquick num tubo de 2,0ml e centrifugada por 1 min a 10000 x g. Posteriormente a coluna foi lavada com 750 µl de tampão PE e centrifugado novamente nas mesmas condições. O líquido foi descartado e a coluna centrifugada por 1min. A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5ml e o DNA purificado eluído em 30 a 50 µl de tampão EB (Tris-Cl, pH8,5). O tampão foi depositado exatamente no centro da membrana da coluna e o conjunto centrifugado novamente.

O sequenciamento foi realizado utilizando-se kit comercial BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA). A eletroforese foi realizada no sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) pertencente à Plataforma PDTIS de sequenciamento da Fiocruz.

As sequencias de nucleotídeos obtidas foram alinhadas usando *BioEdit Sequence Alignment Editor*, depositadas no GenBank *database* e comparadas com sequências disponíveis, incluindo sequências protótipos de cada genótipo. Árvores filogenéticas foram construída usando método *Neighbor-joining* no programa MEGA versão 5.1, a distância genética calculada com modelo Kimura 2 parâmetros, usando 2000 pseudo-réplicas.

4.4.5 Astrovírus

A detecção dos AstV foi realizada seguindo o protocolo de RT-PCR proposto por Noel *et al.* (1995), com algumas modificações, utilizando o par de iniciadores Mon 269 (nt4526 a 4545) e Mon 270 (nt 4955 a 4974), localizados na ORF2. PCR em tempo real foi realizada em um StepOnePlus Real Time PCR system[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA) com 25 µl de volume de reação, contendo 15 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 15% de glicerol, 0,2 U AMV (TakaRa, Japão), 0,5 U Taq DNA polimerase (Promega, EUA), 200 µM dNTPs, 7,5 mM MgCl₂, 5 µl de amostra. Os iniciadores foram colocados numa concentração de 0,8 µM e a sonda a 0,4 µM. Os ciclos de reação foram assim estabelecidos: transcrição reversa por 25 minutos a 42°C; ativação da polimerase por 1 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de PCR de 15 s a 94°C, para desnaturação, 20 s a

55°C para anelamento e extensão a 72°C por 60 s, seguidos por extensão final a 72°C por 10 min (GABBAY *et al.*, 2007).

4.5 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE GRUPOS SANGUÍNEOS ABH E LEWIS

4.5.1 Fenotipagem sorológica dos sistemas ABO e Lewis

Os grupos sanguíneos ABO foram determinados pelo método de hemaglutinação direta e reversa em tubos e os fenótipos Lewis foram caracterizados por hemaglutinação em gel (Diamed) utilizando-se de eritrócitos do sangue periférico obtido das crianças infectadas com NoV.

4.5.2 Extração do DNA para a genotipagem de FUT 2 e FUT 3

A partir do sangue total, foi realizada a lise celular de eritrócitos para a eliminação dos mesmos, com solução de glicose saturada seguida de centrifugação a 13.000 x g por 1 min. O precipitado foi lavado em água deionizada e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (leucócitos) foi digerido com proteinase K e SDS a 20% à temperatura de 37°C durante 12 horas. Após a digestão enzimática, as proteínas foram precipitadas com solução de NaCl 6 M e submetidas à centrifugação (13.000 x g por 6min). O sobrenadante foi transferido para outro tubo e acrescido de etanol absoluto gelado e submetido à centrifugação por 3 min à 13.000 x g para precipitar o DNA extraído. O DNA foi lavado uma última vez com etanol 70% gelado, centrifugado novamente e ressuspensão em Tampão de Eluição –TE (tris –EDTA) (PROCTER *et al.*, 1997).

4.5.3 Amplificação gênica do FUT 2 e avaliação da mutação G428A

A determinação da mutação G428 A do gene FUT2 foi realizada por amplificação alelo específica (PCR-AE) utilizando como controle da reação, a amplificação de um fragmento de 428 pb do gene do hormônio de crescimento. Os iniciadores específicos estão descritos no Quadro 3 e amplificam um

fragmento de 519/520 pb dependendo do alelo presente, se selvagem ou mutante (PROCTER et al., 1997).

As reações de PCR foram realizadas num volume final de 12,5 µl nas seguintes condições: 10 mM de Tris-HCl; 1,5 mM de MgCl₂; 50 mM de KCl; 200 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 25 pmol/µl de cada iniciador e 0,25 U de Taq polimerase.

A amplificação foi realizada seguindo os seguintes ciclos térmicos: 5 ciclos de 96 °C/25s, 70°C/45s e 72°C/45s; 21 ciclos a 96°C 25s, 65°C 50s, 72°C 45s; 4 ciclos a 96°C 25s, 55°C 60s, 72°C 120s.

Os produtos da amplificação foram resolvidos em gel de agarose a 2% e observados conforme anteriormente descrito.

4.5.4 - Amplificação gênica alelo específica do gene FUT3

A genotipagem de FUT3 foi fundamentada na amplificação alelo específica (PCR-AE) para a determinação de quatro mutações: T59G, T202C, C314T e T1067A. Como controle interno da reação, foi utilizado um fragmento do gene do hormônio do crescimento humano, produzindo um fragmento de 428 pb. (Tab. 03) Para detectar cada mutação, foram realizadas duas reações de amplificação sendo que num tubo foi colocado o iniciador *sense* para o alelo selvagem e no outro o iniciador *sense* para o alelo mutante. Em ambos os tubos foram adicionados o iniciador *anti-sense* e o par de iniciadores do controle interno (hGH-1 e hGH-2).

As reações de PCR foram realizadas num volume final de 12,5 µl nas seguintes condições: 10 mM de Tris-HCl; 1,5 mM de MgCl₂; 50 mM de KCl; 200 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 25 pmol/µl de cada iniciador; 0,25 U de Taq polimerase e 100 – 200 ng do DNA genômico. Os ciclos utilizados foram: para as mutações T59G, T202C e C314T – 5 ciclos a 96 °C 20s, 70°C 45s, 72°C 25s; 21 ciclos a 96°C 25s, 65°C 50s, 72°C 30s; 4 ciclos a 96°C 30s, 55°C 60s, 72 °C 90s – para a mutação T1067A – 35 ciclos a 94°C 60 °C e 72°C todos por 1 min.

Os produtos das amplificações foram analisados em gel de agarose a 1% e observados conforme previamente descrito.

Quadro 3. Iniciadores utilizados para a detecção das mutações nos genes FUT2 (mutação G428A) e FUT3.

Iniciador	Mut	Sequencia 5' to 3'	Produto
hGH1	Control	GCCTTCCCAACCATTCCTT	428 pb
hGH2	Control	TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC	
Se-as	G428A	GGCTGCCTCTGGCTTAAAG	520 pb
Se-a selvagem	G428A	GCTACCCCTGCTCCTGG	
Se-a mutante	G428A	CGGCTACCCCTGCTCCTA	
III-55as	Antissense	TTCTGGAGGGGAGAGGCT	
III-48s selvagem	T59G	CGCTGTCTGGCCGCACT	1186 pb
III-47s mutante	T59G	GCTGTCTGGCCGCACGG	
III-50s selvagem	T202C	CCCTCCTGATCCTGCTATG	1045 pb
III-49s mutante	T202C	ACCCTCCTGATCCTGCTAC	
III-52s selvagem	C314T	GTACCCACAGGCAGACACG	932 pb
III-51s mutante	C314T	TGTACCCACAGGCAGACAT	
III-54s selvagem	T1067A	CCAGACGGTGCGCAGCAT	180 pb
III-53s mutante	T1067A	CCAGACGGTGCGCAGCAA	

4.6 ANÁLISE DE DADOS

Todas as informações foram codificadas e armazenadas anonimamente em um banco de dados criado para este fim. Foi utilizado o programa estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0. As frequências de infecção por cada vírus, faixas etárias e outras distribuições julgadas pertinentes foram apresentadas na forma de tabelas. Em função das adaptações realizadas nas estratégias de coleta ao longo do trabalho e a não uniformização de um modelo de estudo epidemiológico, não foram estabelecidas as prevalências dos diferentes vírus e subclassificações. Para a distribuição dos NoV, foi utilizado o teste exato de Fisher, bicaudal, através do programa GraphPad versão 5.0a e valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4.7 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFES sob o número 129/06 e 002A/08.

5 ARTIGO (S)

5.1 Revista PLoS ONE, submetido em 8/02/2013; aceito em 08/06/2013; publicado em 22/07/2013

Vicentini F, Denadai W, Gomes YM, Rose TL, Ferreira MSR, Le Moullac-Vaidye B *et al.* Molecular characterization of norovirus and HBGA from infected Quilombola children in Espírito Santo state, Brazil. **PLoS ONE** 8(7):e69348. 2013. doi:10.1371/journal.pone.0069348.

5.2 Revista J Clin Virol, submetido em 30/07/2013

Diversity of HAdV types in feces of black children from Quilombola communities, southeast Brazil.

Vicentini, F; Denadai, W, Gomes, Y.M; Barreira, DMPG; Portes, SAR; Xavier, MPTP; Miagostovich, MP; Leite, JPG; Spano, LC.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF NOROVIRUSES AND HBGA FROM INFECTED QUILOMBOLA CHILDREN IN ESPÍRITO SANTO STATE, BRAZIL

FERNANDO VICENTINI^{1,2,*}; WILSON DENADAI¹; YOHANNA M. GOMES³; TATIANA L. ROSE⁴; MÔNICA S.R. FERREIRA⁴; BEATRICE L. LE MOULLAC-VAIDYE^{5,6,7}; JACQUES LE PENDU^{5,6,7}; JOSÉ P.G. LEITE⁴; MARIZE P. MIAGOSTOVICH⁴; LILIANA C. SPANO³.

¹ Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, Espírito Santo, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. Brazil.

³ Departamento de Patologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

⁴ Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Nantes, France.

⁶Centre de Recherche en Cancérologie, Nantes, France.

⁷Université de Nantes, Nantes, France.

* E-mail: fernandovicentini@ceunes.ufes.br

ABSTRACT

Noroviruses (NoV) are the main etiological agents of gastroenteritis outbreaks worldwide and susceptibility to NoV infection has been related to the histo-blood group antigen (HBGA). This study aimed to determine the prevalence of NoV strains and to evaluate the HBGA phenotype and genotype of children from semi-isolated Quilombola communities, descendants of black slaves in Brazil. A total of 397 children up to eleven years old, with and without diarrhea, from Quilombola Communities in the Espírito Santo State, Brazil, were investigated for the presence of NoV from August 2007 to September 2009. Feces were collected from all the children, and blood from the NoV positive children. NoV was screened by reverse transcription-PCR with primers for the RNA-dependent

RNA polymerase region; genogroup was determined by PCR with primers for the C and D regions and genotyped by sequencing. HBGA phenotype was performed by gel-spinning and *FUT2* and *FUT3* were analyzed by PCR or sequencing analysis. NoV were detected in 9.2% (12/131) of diarrheic and 1.5% (4/266) of non-diarrheic children ($p < 0.05$, Fisher's exact test). GI and GII genogroups were present in 12.5% and 87.5% of the samples, respectively. The following genotypes were characterized: GII.4 (25%), GII.12 (25%), GII.6 (12.5%) and GI.1 (6.3%), GI.3 (12.5%) and GI.4 (6.3%). Children infected with NoV showed the A (n=6), O (n=6), and B (n=2) HBGA phenotypes, and 13 of them were classified as secretors (*Se*) and one as a non secretor (*se*). Mutations of $Se^{40, 171, 216, 357, 428, 739, 960}$ were found for the *FUT2* gene and mutations of $Le^{59, 202, 314}$ for the *FUT3* gene. The only *se* child was infected by NoV GI, whereas the *Se* children were indiscriminately infected by GI or GII. This study showed rates of NoV infection in symptomatic and asymptomatic Quilombola children consistent with other studies. However, children under 12 months were seven times more affected than those between 1 and 5 years old. GII.12 was as frequent as GII.4 and GI.1 and GI.4 were described for the first time in Brazil. Owing to the small number of cases studied, no clear pattern of susceptibility and/or HBGA resistance could be inferred.

INTRODUCTION

Gastroenteritis of infectious etiology is still an important cause of morbidity in the human population worldwide [1]. Diarrhea and vomiting associated with a lack of access to primary health care and supportive treatment for dehydration, can lead to serious clinical consequences, particularly in developing countries [2,3]. Noroviruses (NoVs) are the main viral agents in acute diarrhea outbreaks and sporadic cases for all age groups worldwide, except for rotaviruses in children under three years old, leading to more than 1 million hospitalizations annually [1,3]. However, this scenario is changing in countries, including Brazil [4] that have adopted the use of rotavirus vaccines tending to pass all age

groups be headed by NoV. In addition, asymptomatic excretion is reported in healthy individuals, favoring virus transmission [1,2,3,5].

Human NoVs belong to the *Caliciviridae* family, *Norovirus* genus and are classified into three genogroups: GI, GII, and GIV. Differences in the sequence of the major viral capsid proteins (VP1) allow further classification into eight GI and twenty-one GII genotypes and one GIV genotype [6]. GII.4 is considered the most prevalent genotype worldwide [1,7].

At present, there is no *in vitro* replication system available for human NoVs. Nevertheless, the expression of recombinant VP1 allows the *in vitro* reconstruction of VLPs (virus-like particles), morphologically and antigenically similar to the wild virions [8] that show bind to molecules characterized as histo-blood group antigens (HBGA) [9,10,11,12,13,14]. HBGAs are oligosaccharides synthesized by the stepwise addition of monosaccharides onto glycan precursors via the glycosyltransferases FUT2, FUT3 and A/B of the ABO and Lewis blood group systems. The FUT2 enzyme adds a fucose, in the α 1,2 linkage, onto a galactose of the precursor, generating the H antigens. The FUT3 enzyme adds a fucose residue, in the α 1,4 (or 1,3) position, onto the N-acetylglucosamine of the precursor, generating the Lewis a (Le^a) or the Lewis b (Le^b) antigens when combined with the α 1,2 fucose residue. The A or B enzymes catalyze the addition of an N-acetylgalactosamine or a galactose onto the H antigens, giving rise to the A and B antigens, respectively. The *FUT2*, *FUT3* and *ABO* genes possess functional alleles encoding the FUT2, FUT3, A and B enzymes respectively. These *FUT2*, *FUT3* and *ABO* genes also possess null alleles which are unable to generate active enzymes. Individuals who have the H antigen in their epithelial tissues and secretions are called secretors. In contrast, individuals who inherited two *FUT2* null alleles are devoid of H, Le^b , A and B antigens and are called non-secretors. Similarly, *FUT3* null homozygotes lack the Le^a and Le^b antigens and homozygotes for O alleles (null alleles of the *ABO* gene), are devoid of either A and B antigens and are therefore of the blood group O [15].

Approximately 80% of the human population has a secretor phenotype (*Se*) and is considered to be susceptible to NoV infections by the majority of strains

with a variation depending on the ABO phenotype and on the ability of strains to recognize the A, B, H or Le^b antigens. The remaining 20% of the population with the non secretor phenotype (*se*) is considered to be naturally resistant to most NoV strains [16,17,18,19]. However, VLPs from some GI and GII strains have been reported to bind to carbohydrates such as Le^a or Le^x mainly present in non-secretors. Accordingly, non-secretor individuals are occasionally infected by NoVs [14,20,21,22,23].

Although HBGA polymorphisms representing populations from the five continents have already been characterized, the populations studied hitherto in South America have been restricted to the Colombian Amerindians, Maya, Suruí, Karitiana and Pima Indians [24]. This is the first study involving a black population from Southeastern Brazil, and moreover, infected with NoV. This population consists of descendants of former African slaves, who live in semi-isolated communities, called "Quilombola Communities" and the people living there are known as "quilombolas" [25]. Even today, in the 21st century, they are still underserved communities with poor sanitary conditions, conducive to gastrointestinal diseases.

The aims of this study were: i) to determine the prevalence and genotypes of NoV among children up to 11 years old, with and without diarrhea, who are residents in the Quilombola Communities in the Espírito Santo State, Southeastern Brazil and; ii) to characterize the HBGA phenotypes and genotypes of the infected children to elucidate their susceptibility to NoV infection.

MATERIALS AND METHODS

STUDY DESIGN AND SITE DESCRIPTION

This is a descriptive study with Quilombola children up to 11 years old, who are descendants of slaves and who live in Quilombola Communities located in the semi-isolated rural areas, known as North Sapê, in the North of Espírito Santo State, Southeastern Brazil. Today there are 30 communities in the North Sapê region with an estimated population of more than 3,600 people, 950 residences and numerous farms dedicated to the cassava plant. They are between 6.21 mi

(10 km) and 18.64 mi (30 km) from urban centers and from each other, and are connected by dirt roads of very difficult access.

This study was approved by the Ethics Research Committee of the Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo (002A/08) and Statement of Consent was obtained from the guardians and from the children themselves, whenever appropriate.

FECAL AND BLOOD SPECIMENS

A total of 397 fecal specimens were obtained, 131 (33%) from children with diarrhea (symptomatic) and the remaining 266 (67%) from children without diarrhea (asymptomatic), matched by community, between August 2007 and September 2009. To carry out the HBGA studies, blood samples (3 ml) were collected by venipuncture in tubes containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant from children who were positive for NoV. Blood samples were immediately analyzed for phenotype as described below; leukocytes were obtained by centrifugation at 2,000xg for 15 min and stored at -20°C for further analysis. [26]. Feces and peripheral blood leukocytes were frozen at -20°C for nucleic acid extraction.

NOROVIRUSES DETECTION AND GENOGROUP AND GENOTYPE CHARACTERIZATION

Viral nucleic acid was extracted from a 10% fecal suspension in Tris-calcium by using a guanidine isothiocyanate and silica method, as previously described [27]. Complementary DNA (cDNA) was obtained in a reverse transcription reaction using the 20mU random primer pd(N)₆TM (Amersham Bioscience, UK) and the SuperscriptIITM reverse transcriptase (Invitrogen, USA) [28].

NoV detection was performed through PCR using two sets of primers which hybridize to the *RdRp* gene (RNA-dependent RNA polymerase - ORF1 viral genome), MON 431/433 and MON 432/434, as described by Beuret et al. (2002) [28] and following the protocols proposed by Victoria et al. (2007) [29]. The genogroup determination was conducted with two PCR mixtures containing a pair of primers for GI (SRI-1/SRI-2) [28] and GII (MON381/MON383) [30]

and the primers (G1SKF/G1SKR and G2SKF/G2SKR) [31], and (Cap A, B1, B2/Cap C, D1, D3) [32], specific for the C and D region of the VP1 capsid gene (ORF2), respectively. All primers used are described in Table 1.

NoVs genotyping was determined by partial sequencing of PCR amplicons obtained with primers for ORF-2 (G1SKF/G1SKR and G2SKF/G2SKR for the C region and Cap A, B1, B2/Cap C, D1, D3 for the D region of the VP1 gene) [31,32] (Table 1). Amplicon purification was performed using the QIAquick[®] kit (Qiagen) and sequencing using the commercial kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA). Sequences were aligned using the BioEdit Sequence[®] Alignment Editor version 7.0.9.0, deposited in the GenBank database and then compared with sequences of Brazilian and reference samples of each genotype. A phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-joining method using the MEGA program version 5.10, and the genetic distance was calculated with the Kimura 2 parameter model, using 2,000 pseudo-replicates.

Nucleotide sequences obtained in this study were submitted to the National Center for Biotechnology Information (Gen Bank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and received the following accession numbers: region C, Q51-JX893035, Q220-JX898882, Q230-JX898883, Q225-JX898884, Q254-JX898885, Q352-JX898886, Q322-JX898887, Q323-JX898888, Q325-JX898889, Q151-JX898890. Region D, Q151-KC113519, Sape95-KC113520, Q278-KC113521, Q225-KC113522, Q326-KC113523 and Q323-KC113524.

HISTO-BLOOD GROUP ANTIGEN

Phenotypic analysis

The characterization of the blood groups was carried out with the peripheral blood samples from the NoV positive children by: (i) the tube agglutination technique with anti-A, anti-B, anti-AB and anti-D (DiaClon[™], Diamed, Br, BIO RAD) monoclonal antibodies (MAbs), and (ii) the Lewis antigens detection system and the secretor status categorization by gel-centrifugation was

performed with capture MAbs anti-Le^a or anti-Le^b (DiaClon™, Diamed, Br, BIO RAD) in two different reactions, according to the manufacturer's instructions.

Genotypic Analysis of the *FUT2* gene (secretor)

Genotype analysis was carried out with DNA extracted from peripheral blood leukocytes by treatment with 1.6 M sucrose and 10 mg/ml proteinase K [33]. Inactivating mutations of *FUT2* gene were screened by: (i) PCR for the most common mutation G428A with specific primers for the mutation *Se* antisense (as) combined with *Se* 1s sense (s) for the wild-type allele and PCR with primers for the mutant gene *se* with *Se2s*, as previously described [26] (Table 2) and; (ii) gene sequencing of exon 2, using a set of primers designed for this study from the reference sequence available in GenBank (NCBI). The primers were targeted to amplify the entire exon, from the position -61F, up to +98 R, as follows:

Forward primers: (i) position -61 / hFut2 -61F (TGAGGTGCCTGCCCAACC ACTCTGT); (ii) position 1 / hFut2 met (ATGCTGGTCGTTTCAGA TGCCT); (iii) position 489 / hFut2.3 (GATCCTCCAGGA GTTCACCCTGCA); (iv) position 699 / hFut2 699 F (CGCTACAG CTCCTCATCTTCGTG).

Reverse primers: (i) position +98 / hFut2 +98 R (AGAGATGGGTCCTGCTCA TGGAAC); (ii) position 1009 / hFut2 stop (TGTCCTCCCTTACTCAAGCACTAA); (iii) position 569 / hFut2 564 R (AGCCGGCCGGGCACCTTTGTAGGGGTCCAT); (iv) position 281 / hFut2 267 R (TCATCTTGGCCAG GGCGTACAGTGT).

A 50 µl final reaction mixture contained 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 µM of each primer, 1 unit of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), 1X PCR buffer and 1 µl of DNA under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 2 min followed by 25 cycles at 95°C for 45 s, 60°C for 45 s and 72°C for 75 s, and a final extension at 72°C for 5 min. The gene for human growth hormone (HGH) was used as the internal control of the reaction [34].

For sequencing, the PCR products were purified with ExoSAP-IT™ (GE / USB). The thermal cycle was 37°C and 80°C for 15 min. each. Sequencing was performed with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied

Biosystems, CA, USA). Sequences were aligned using the BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.9.0.

Genotypic Analysis of the *FUT3* gene (Lewis)

The presence of four major human *FUT3* mutations T59G, T202C, C314T and T1067A was investigated [26]. Two PCRs were performed for each mutation with a set of primers containing III-55 antisense and (i) the initiator for the wild-type allele and (ii) the initiator for the mutant allele (Table 2). One microliter of DNA extracted was added to a 50 μ l final reaction mixture containing 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, 0.2 μ M of each primer and 1 unit of GoTaq[®] DNA polymerase (Promega, Madison, USA). Amplification was performed under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 2 min followed by 25 cycles at 95°C for 45 sec, 60°C for 45 s and 72°C for 75 s, and final extension at 72°C for 5 min. Similarly to the previous item, an internal control reaction was performed.

STATISTICAL ANALYSES

The two sided Fisher's exact test was performed for comparisons between groups using the GraphPad program version 5.0a, and p values below 0.05 were considered significant.

RESULTS

Detection and molecular characterization of noroviruses.

Noroviruses were detected in 4% (16/397) of the fecal specimens obtained from Quilombola children, of whom 131 (33%) were diarrheic (symptomatic) and 266 (67%) were without diarrhea (asymptomatic). Seventy percent of the cases occurred between March and May 2009. The ratio of NoVs positivity among symptomatic and asymptomatic children was 9.2% (12/131) and 1.5% (4/266), respectively. Children up to 12 months old corresponded to 9.6% (38/397) of the specimens and represented 50% (8/16) of the NoVs positive cases and 87.5% (7/8) of these occurred in symptomatic children. The ratio of

positive cases among children up to 12 months old was 21% (8/38), whereas in children between 1 and 5 years old it was 3.2% (5/155). The difference in NoV prevalence between children up to 12 months old and older children was statistically significant ($p < 0.002$, Fisher's exact test).

Among the genogroups characterized, GII represented 87.5% (14/16) and GI 18.5% (3/16) of the cases; one was a GI and GII mixed infection.

Twelve strains were genotyped by means of partial sequence analysis of ORF2 (regions C and D), evidencing GII.4 (n=4), GII.12 (n=4), GII.6 (n=2), and GI.3 (n=2) genotypes (Table 3, Figures 1 and 2). GII.6 was detected exclusively among asymptomatic children, while the other genotypes were found only among symptomatic cases. The four strains that could not be genotyped were three GIIs (two from symptomatic cases and one from an asymptomatic case), and one GI (from an asymptomatic case). NoV GI.1, GI.4 and GII.6 (Figures 1 and 2) were also detected in an urban community, consisting of predominantly black people, near the traditional Quilombola Communities (unpublished results).

HBGA was determined for 14 out of the 16 children infected with NoV, six belonged to blood group A, six to O and two to B (Table 3); 13 children were characterized as *Se* and one as *se*. The *Se* children were infected by GI and GII NoV strains, while the only *se* was infected by a GI strain. The frequency of *se* individuals in this population is close to 0.2 (data not shown) and individuals of this phenotype are under-represented among infected children (1/14). All three children infected by GI belonged to the O blood group, while those infected by GII were equally distributed between A and O blood groups. Here again, this difference did not reach statistical significance owing to the small number of cases.

Characterization of the polymorphisms of the *FUT2* and *FUT3* genes

The full coding sequence of the *FUT2* gene revealed several mutations in the black population studied, at the 40, 171, 216, 357, 428, 739 and 960 positions (Table 4). The inactivating mutation G428A was in a homozygous state in the only child with *se* phenotype.

For the *FUT3* gene, five children were homozygotes for the wild-type alleles. The mutations Le^{59} (n=5) and $Le^{202,314}$ (n=4) were always detected in the heterozygous state, both in those phenotypically characterized as Lewis positive and those characterized as negative, suggesting that other mutations could account for the Le (a-b-) phenotype in this population (Table 3).

DISCUSSION

NoVs were found in the Quilombola children at rates consistent with other studies addressing community infection by NoVs [Mashallet al., 2003; Lau et al., 2004; Monica et al., 2004

]. Despite this, the rate of NoVs among the symptomatic and asymptomatic children was relatively high, since the studied communities are rural and sparsely populated, which could compromise the transmission of virus particles. Although the positive NoVs cases were concentrated between March and May 2009, the great diversity of the genotypes coupled with the small number of cases in each community at each collection date does not allow this result to be characterized as an outbreak.

NoV infection is known to occur in individuals of all ages due to its vast diversity of genotypes, its infectivity, the high rates of mutation and recombination which together lead to antigenic varieties and escape from the host immune system [29,38,39,40,41]. However, in our study, most cases of symptomatic NoV infection occurred among children up to 12 months old. Although this age group corresponded to only 9.6% of the total of samples collected, it had a higher prevalence compared to the prevalence found in the 1 to 5 year-old

children, suggesting there was either a greater susceptibility of very young children or early immunization in this type of community. Ferreira et al. (2012) [42] also showed a higher prevalence of NoVs in the youngest children, but in children older than those in this present study.

This study of NoVs in 30 Quilombola communities of Southeastern Brazil was conducted in parallel to the recently published study carried out in a similar community in the North of Brazil [25]. These regions are approximately 2,300 km apart from each other. In contrast to our results, the study in the North showed twice the number of NoV cases in children with diarrhea but did not find the virus in any of the asymptomatic children [Aragão et al., 2013, 25]. This study complements earlier studies with hospitalized patients or outpatients at emergency rooms that involved patients with a more severe clinical profile [3]. Ferreira et al. (2012) [42] in a 15 year retrospective study of outbreaks or sporadic cases of gastroenteritis, found NoVs in 28.8% of all cases.

Most of the NoV strains characterized in this study belonged to GII, in agreement with other studies that show GII as the most prevalent in the world, whereas GI is sporadically present at high prevalence [1,7,35]. However, a third the cases here consisted of GI, a rate that can be considered relatively high for Brazil since previous studies have described lower frequencies [3,42,43] as well as the Quilombola study in the North [25], although Soares et al. (2007) [44] described a GI prevalence of 47.6% in Brazil.

This study shows the first description for GI.1 and GI.4 in Brazil among the three different GI genotypes detected (GI.1, GI.3 and GI.4), which represents a relatively high diversity. Studies in others countries have also shown high diversity of GI types, albeit with a low frequency for each [43,45]. Generally, the diversity observed for GI and GII was interesting because they were found in semi-isolated communities. A broad genetic diversity was also observed in the Quilombola children in the North of Brazil [25].

The GII.12 strains align very closely to those referred to as "post-2009", when the rise of a new NoV GII.12 recombinant in the U.S. winter 2009/2010 was described [40]. Interestingly, stools of the present study were collected six months before the North American samples (March 2009), suggesting that the

new GII.12 recombinant probably circulated in Brazil concomitantly to the U.S. Nevertheless, one should take into account that the sequence alignment was made on the basis of the C and D regions of VP1 gene, requiring the sequence of B region and its interface with C region to prove a recombinant phenomenon, as recently described by Fumian et al. (2012) [39].

In the last decade the most prevalent genotype, in people of all ages worldwide has been the GII.4 [1,43]. The GII.4 strains observed were similar to the 2006b variant, shown in Figure 1 by the prototype GQ246799.1/Dijon/2009/FRA. This variant has been detected in at least seven other states in Brazil [43]. In terms of its epidemiological impact, worldwide since 1995, this genotype has been widely studied in order to understand its mechanisms of viral evolution and escape from the immune system as well as its ability to recognize HBGAs [38,46,47,48,49]. In the present study, we observed that it was not as overwhelmingly represented as previously reported but was similar in prevalence to GII.12. This suggests that GII.4 may be in the process of being replaced by the new GII.12 recombinant as the dominant circulating strain.

To assess if there was any parasite-host relationship typical for Brazil, we characterized the HBGA phenotype and genotype of the Quilombola children infected with NoVs, as representative of people of African descendant in Brazil. They correspond to 50% of the population, according to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE 2011).

Here, no significant association between infection and ABO, secretor, or Lewis phenotypes was observed. Nevertheless, all the patients infected by a GII strain, for whom HBGAs typing was performed, were all *Se*, apart from a single *se*, who was found infected, suggesting a lower likelihood of *se* becoming infected. GI strains belonging to the Lewis-binder group have been described and the single *se* patient was Lewis positive, making it plausible that the GI strain involved in that case belonged to this group. Unfortunately, it was not possible to genotype and amplify the VP1 coding sequence of that GI strain in order to assay its HBGA specificity. Previous studies showed an association with infection and the *Se* phenotype [16]. Nevertheless cases of infected *se* individuals have been described [23]. Consistent with this, several strains

belonging to either GI or GII were found capable of binding to carbohydrates present in the *se* individuals, such as the Le^a antigen [14,23].

Since the frequency of *se* individuals in this population is close to 0.2 (data not shown), individuals of this phenotype are under-represented among infected children (1/14). However, this is not statistically significant owing to the small number of cases available.

Genetic sequencing highlighted *FUT2* mutations (*Se*^{40, 171,216,357,428,739 and 960}) that have been previously described (BGMUT / NCBI) [50]. There are descriptions of many *FUT2* alleles in the human population, with 19 alleles containing a single substitution (SNP - single nucleotide polymorphisms). Among these, *G428A* is the main inactivating mutation of *FUT2* responsible for the *se* phenotype since it generates a stop codon at position 143 (Trp-X) [51]. This mutation is present in European, African and Iranian populations [52]. In this study, the *Se* phenotype was found in the majority (14/15) of individuals tested. The *se*⁴²⁸ was homozygous in the single individual with a *se* phenotype.

In conclusion, this work revealed that, despite the peculiar characteristics of the Quilombola population under study, rates of NoVs infection in symptomatic and asymptomatic children were consistent with other studies and describes for the first time the circulation of GI.1 and GI.4 in Brazil. Moreover, there was a greater frequency of younger children (< 1 year) among the NoV infected children. The preliminary analysis of the genetic diversity of the HBGAs of the Quilombola population revealed a surprising number of similarities with other populations. Although the limited number of positive samples jeopardizes an appropriate analysis, the results showed diverse genotypes of NoV infecting African descendents belonging to different ABO, secretor and Lewis blood groups.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the children and their tutors, the Community Health Agents and Leaders, the Municipal Health Department of São Mateus and Conceição da Barra Municipalities. Special thanks to Dr Débora Barreto

Teresa Gradella and Nathalie Ruvoën-Clouet for scientific support on HBGA molecular characterization.

REFERENCES

1- Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, et al. (2008) Systematic literature review of role of norovirus in sporadic gastroenteritis. *Emerg Inf Dis.* 14: 1224-1231.

2- Glass RI, Parashar UD, Estes MK. (2009) Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 361: 1776-1785.

3- Barreira DMPG, Ferreira MSR, Fumian TM, Checon R, Sadovsky ADI, et al. (2010) Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern, Brazil. *J. Clin. Virol.* 47(1): 60-64.

4- Desai R, Oliveira LH, Parashar UD, Lopman B, Tate JE, et al. (2011) Reduction in morbidity and mortality from childhood diarrhoeal disease after species A rotavirus vaccine introduction in Latin America - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 106(8): 907-911.

5- Trivedi TK, Desai R, Hall AJ, Patel M, Parashar UD, et al. (2012) Clinical characteristics of norovirus-associated deaths: A systematic literature review. *Am J Infect Control.* Dec 21. pii: S0196-6553(12)01155-8. doi: 10.1016/j.ajic.2012.08.002.

6- Hall AJ, Vinjé J, Lopman B, Park GW, Yen C, et al. (2011) Center for Disease Control and Prevention. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR.* 60(3): 1-15.

7- Bennett S, MacLean A, Miller RS, Aitken C, Gunson RN. (2013) Increased norovirus activity in Scotland in 2012 is associated with the emergence of a new norovirus GII.4 variant. *Euro Surveill.* 18(2): pii=20349.

Patel et al., 2008;

8- Jiang X, M Wang, DY Graham, MK Estes. (1992) Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol.* 66: 6527-6532.

9- Marionneau S, N Ruvöen-Clouet, B Le Moullac-Vaidye, M Clement, A Cailleau-Thomas, et al. (2002) Norwalk virus binds to histo-blood group antigens on gastro-duodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122, 1967-1977.

10- Harrington PR, L Lindensmith, B Yount, CL Moe, RS Baric. (2002). Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J Virol.* 76: 12325-12343.

11- Huang P, Farkas T, Marionneau S, Zhong W, Ruvoen-Clouet N, et al. (2003) Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J Infect Dis.* 188: 19–31.

12- Nilsson J, Rydell GE, Le Pendu J, Larson G. (2009) Norwalk virus-like particles bind to A, H and difucosylated Lewis but not to B histo-blood group active glycosphingolipids. *Glycoconj J.* 26: 1171-1180.

13- Rydell GE, Nilsson J, Rodriguez-Diaz J, Ruvoën-Clouet N, Svensson L, et al. (2009) Human noroviruses recognize sialyl Lewis x neoglycoprotein. *Glycobiology* 19: 309-320.

14- Kubota T, Kumagai A, Ito H, Furukawa S, Someya Y, et al. (2012) Structural basis for the recognition of Lewis antigens by genogroup I norovirus. *J Virol.* 86(20): 11138-11150.

- 15- Marionneau S, A Cailleau-Thomas, J Rocher, B Le Moullac-Vaidye, N Ruvoën-Clouet, et al. (2001) ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 83: 565-573.
- 16- Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, et al. (2003) Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med.* 9: 548-553.
- 17- Hutson AM, Airaud F, Le Pendu J, Estes MK, Atmar RL. (2005) Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera. *J Med Virol.* 77: 116–120.
- 18- Thorven M, A Grahn, KO Hedlund, H Johansson, C Wahlfred, et al. (2005) A homozygous nonsense mutation (428G>A) in the human FUT2 gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *J Virol.* 79: 15351-15355.
- 19- Tan M, M Jin, H Xie, Z Duan, X Jiang, Z Fang. (2008) Outbreak studies of a GII-3 and a GII.4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection. *J Med Virol.* 80: 1296-1301.
- 20- Huang P, Farkas T, Zhong W, Tan M, Thornton S, et al. (2005) Norovirus and histo-blood group antigenic demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J Virol.* 79: 6714-6722.
- 21- Bucardo F, E Kindberg, M Paniagua, A Grahn, G Larson, et al. (2009) Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua. *J Med Virol.* 81: 728-735.

22- de Rougemont A, N Ruvoën-Clouet, B Simon, M Estienney, C Elie-Caille, et al. (2011) Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J Virol.* 85: 4057-4070.

23- Nordgren J, Kindberg E, Lindgren P, Matussek A, Svensson L. (2010) Norovirus gastroenteritis outbreak with a secretor-independent susceptibility pattern, Sweden. *Emerg Inf Dis.* 16: 81-87.

24- Ferrer-Admetlla A, Sikora M, Laayouni H, Esteve A, Roubinet F, et al. (2009) A natural history of FUT2 polymorphisms in humans. *Mol. Biol. Evol.* 26(9): 1993-2003.

25- Aragão GC, Mascarenhas JDP, Kaiano JHL, Lucena MSS, Siqueira JAM, et al. (2013) Norovirus Diversity in Diarrheic Children from an African-Descendant Settlement in Belém, Northern Brazil. *PLoS ONE* 8(2):e56608. doi:10.1371/journal.pone.0056608.

26- Grahn A, Elmgren A, Aberg L, Svensson L, Jansson PA, et al. (2001) Determination of Lewis FUT3 gene mutations by PCR using sequence-specific primers enables efficient genotyping of clinical samples. *Hum Mutat.* 18(4): 358-359.

27- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME, et al. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 28(3): 495–503.

28- Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Luthi TM. (2002) Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *App Environ Microbiol.* 68: 1925-1931.

29- Victoria M, Miagostovich MP, Ferreira MS, Vieira CB, Fioretti JM, et al. (2009) Bayesian coalescent inference reveals high evolutionary rates and expansion of Norovirus populations. *Infect Genet Evol.* 9(5): 927-932.

30- Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, et al. (1997) Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *J Med Virol.* 53: 372-383.

31- Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, et al. (2002) Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Meth.* 100: 107-114.

32- Vinjé J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. (2004) Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Meth.* 116: 109-117.

33- Abdel-Rahman, SZ. (1994) Isolation of DNA using salting-out procedure. *J Biochem Toxicol.* 9: 191-198.

34- Procter J, Crawford J, Bunce M, Welsh KI. (1997). A rapid molecular method (polymerase chain reaction with sequence-specific primers) to genotype for ABO blood group and secretor status and its potential for organ transplants. *Tissue Antigens.* 50: 475-483.

35- Marshall JA, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Cox BJ, et al. (2003) Incidence and characteristics of endemic Norwalk-like virus-associated gastroenteritis. *J Med Virol.* 69: 568-578.

36- Lau CS, Wong DA, Tong LK, Lo JY, Ma AM, et al. (2004) High rate and changing molecular epidemiology pattern of norovirus infections in sporadic cases and outbreaks of gastroenteritis in Hong Kong. *J Med Virol.* 73: 113-117.

- 37- Monica B, Ramani S, Banerjee I, Primrose B, Iturriza-Gomara M, et al. (2007) Human Caliciviruses in Symptomatic and Asymptomatic Infections in Children in Vellore, South India. *J Med Virol.* 79(5): 544-551.
- 38- Donaldson EF, Lindesmith LC, LoBue AD, Baric RS. (2010) Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 231–241.
- 39- Fumian TM, Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, Siqueira AM, et al. (2012) Detection of a novel recombinant strain from the Amazon region of Brazil in 2008. *Arch Virol.* 157(12): 2389-2392. doi: 10.1007/s00705-012-1428-2.
- 40- Vega E, Vinjé J. (2011) Novel GII.12 Norovirus strains, United States, 2009-2010. *Emerg Infect Dis.* 17(8): 1516-1518.
- 41- Zakikhany K, Allen DJ, Brown D, Iturriza-Gómara M. (2012) Molecular Evolution of GII-4 norovirus strains. *PLoS ONE* 7(7):e41625. doi:10.1371/journal.pone.0041625.
- 42- Ferreira MSR, Xavier MPTP, Tinga ACC, Rose TL, Fumian TM, et al. (2012) Assessment of Gastroenteric Viruses Frequency in a Children's Day Care Center in Rio de Janeiro, Brazil: A Fifteen Year study (1994-2008). *PLoS ONE.* 7(3): e33754. doi:10.1371/journal.pone.0033754.
- 43- Fioretti JM, Ferreira MSR, Victoria M, Vieira CB, Xavier MPTP, et al. (2011) Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106(8): 942-947.

- 44- Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MC, Maranhão AG, et al. (2007) Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 13(8): 1244–1246.
- 45- Fukuda S, Takao S, Shigemoto N, Tanizawa Y, Seno M. (2010) Transition of genotypes associated with norovirus gastroenteritis outbreaks in a limited area of Japan, Hiroshima Prefecture, during eight epidemic seasons. *Arch Virol.* 155: 111-115.
- 46- Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, et al. (2008) Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.* 5:e31 doi:10.1371/journal.pmed.0050031.
- 47- Siebenga JJ, H Vennema, DP Zheng, J Vinjé, B E Lee, et al. (2009) Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis.* 200: 802-812.
- 48- Boon D, J E Mahar, E J Abente, C D Kirkwood, R H Purcell, et al. (2011) Comparative evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period. *J Virol.* 85: 8656-8666.
- 49- Bull RA & White PA. (2011) Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends in Microbiol.* 19(5): 233-240.
- 50- Patnaik SK, Helmberg W, Blumenfeld OO. (2011) BGMUT: NCBI dbRBC database of allelic variations of genes encoding antigens of blood group systems *Nucleic Acids Research.* 13: 1–7.
- 51- Kelly RJ, Rouquyer S, Giorgi D, Lennon GG, Lowe JB. (1995) Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group alfa (1,2)-fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating

nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J Biol Chem.* 270: 4640-4649.

52- Koda Y, Tachida H, Liu Y, Soejima M, Ghaderi AA, et al. (2001) Contrasting patterns of polymorphisms at the ABO-secretor gene (FUT2) and plasma alpha(1,3)-fucosyltransferase gene (FUT6) in human populations. *Genetics.* 158: 747-756.

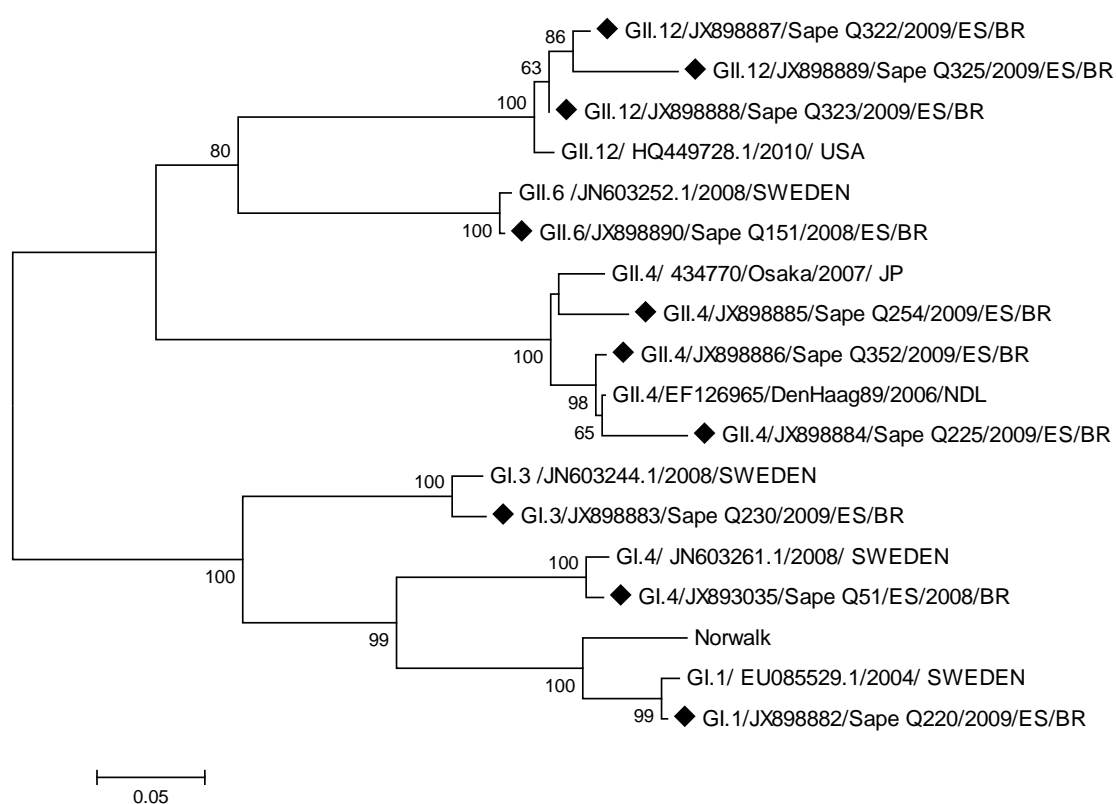


Figure 1. Phylogenetic tree of C region. Phylogenetic tree constructed by the Neighbor-joining method based on the partial nucleotide sequence of the norovirus VP1 capsid protein gene C region. Highlighted strains identified by "Sapê", originated in fecal samples from "Quilombola" children and were analyzed along with the prototype norovirus genotypes of GI, GII and GIV taken from the "GenBank." All strains were identified by genotype / accession number / year / origin. Sapovirus / AB630067.2/2008/JP was added as a reference group. Values of "Bootstrap (2,000 replicates) are shown at the junction of the branches. ● Samples Q51, Q151 and Q220 belong to another study site near the Quilombola communities. ◆ Samples of this study.

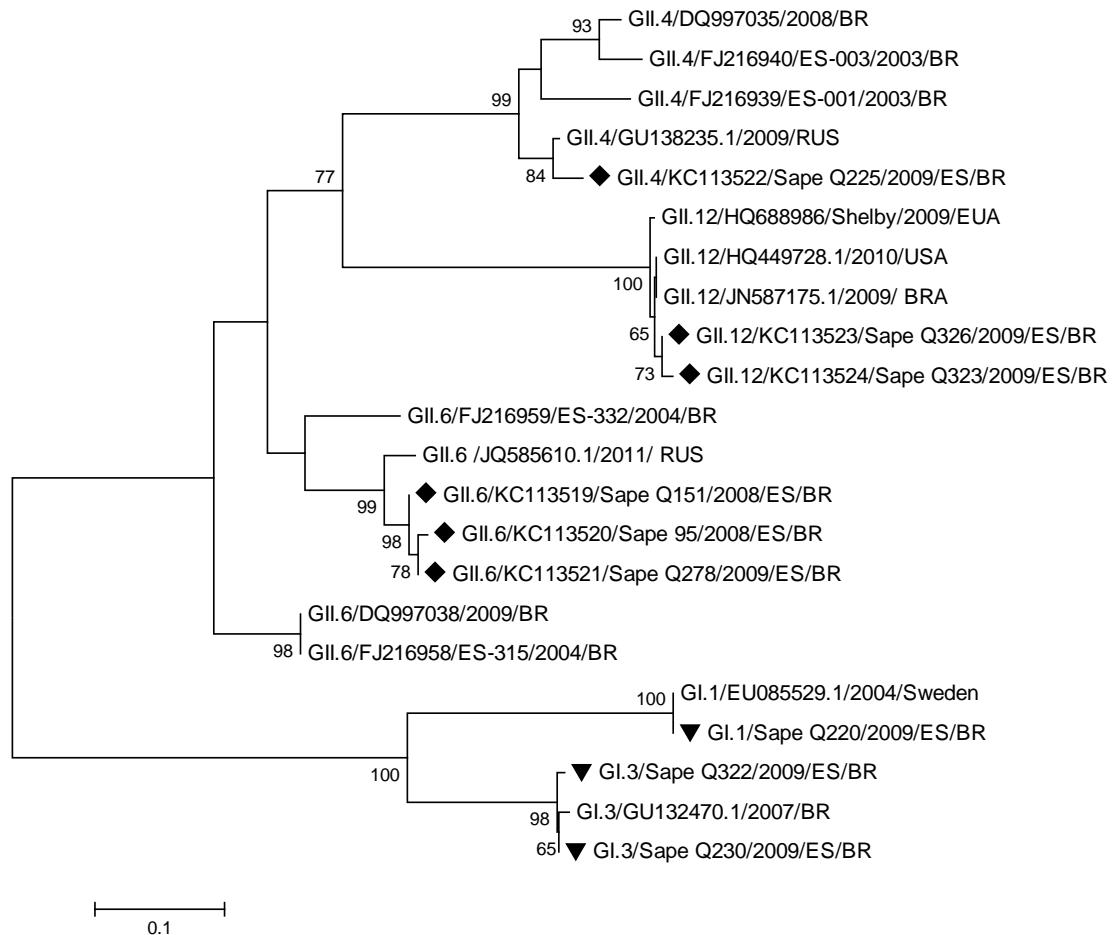


Figure 2. Phylogenetic tree of D region. Phylogenetic tree constructed by the Neighbor-joining method based on the partial nucleotide sequence of the Norovirus VP1 protein gene D region. Highlighted strains identified by "Sapê", originated in fecal samples from "Quilombola" children and were analyzed along with prototype norovirus genotypes of GI and GII taken from the "GenBank." All strains were identified by genotype / accession number / year / origin. Sapovirus / AB630067.2/2008/JP was added as a reference group. Values of "Bootstrap (2,000 replicates) are shown at the junction of the branches. ● Samples Q51 and Q220 belong to another study site near the Quilombola communities. ◆ Samples of this study.

Table 1. Nucleotide sequence of the primers used in amplification and sequencing of the norovirus genome.

Primer	Sequence 5' to 3'	ORF/Region	Position	Fragment	Reference
MON 431	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	ORF1/B	5093	213 pb	30
MON 433	GAA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	ORF1/B	5305		
MON 432	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	ORF1/B	5093	213 pb	30
MON 434	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	ORF1/B	5305		
GI SRI 2	AAA TGA TGA TGG CGT CTA AG	ORF2/C	5344	222 pb	28
GI SRI 3	AAA AYR TCA CCG GGK GTA T	ORF2/C	5566		
GII MON381	CCAGAATGTACAATGGTTATGC	ORF2/C	5362	322 pb	30
GII MON383	CAAGAGACTGTGAAGACATCATC	ORF2/C	5683		
GI Cap B1	TAT GTT GAC CCT GAT AC	ORF2/D	6738	177 bp	32
GI Cap B2	TAT GTI GAY CCW GAC AC	ORF2/D	6738		
GI Cap A	GGC WGT TCC CAC AGG CTT	ORF2/D	6914		
GII Cap D1	TGT CTR STC CCC CAG GAA TG	ORF2/D	6432	253 bp	32
GII Cap D3	TGY CTY ITI CCH CAR GAA TGG	ORF2/D	6432		
GII Cap C	C CCT TYC CAK WTC CCA YGG	ORF2/D	6684		
GI G1SK F	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA	ORF2/C	5342	329 bp	31
GI G1SK R	CCA ACC CAR CCA TTR TAC T	ORF2/C	5671		
GII G2SK F	CNT GGG AGG GCG ATC GCA A	ORF2/C	5058	343 bp	31
GII G2SK R	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT	ORF2/C	5401		

The positions of the primers are relative to the entire genome of the GI Norwalk M87661 and GII Lordsdale X86557 strains.

Table 2. Set of primers used for detecting mutations in FUT3.

Primer	Object	Sequence 5' to 3'	Fragment	Reference
hGH1	Control	GCCTTCCCAACCATTCCTT	428 pb	34
hGH2	Control	TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC		
Se-as	G428A	GGCTGCCTCTGGCTTAAAG	520 pb	26
Se-s selvage	G428A	GCTACCCCTGCTCCTGG		
Se-s mutant	G428A	CGGCTACCCCTGCTCCTA		
III-55as	Reverse	TTCTGGAGGGGAGAGGCT		
III-48s	T59G	CGCTGTCTGGCCGCACT	1186 pb	26
selvage				
III-47s	T59G	GCTGTCTGGCCGCACGG		
mutant				
III-50s	T202C	CCCTCCTGATCCTGCTATG	1045 pb	26
selvage				
III-49s	T202C	ACCCTCCTGATCCTGCTAC		
mutant				
III-52s	C314T	GTACCCACAGGCAGACACG	932 pb	26
selvage				
III-51s	C314T	TGTACCCACAGGCAGACAT		
mutant				
III-54s	T1067A	CCAGACGGTGCGCAGCAT	180 pb	26
selvage				
III-53s	T1067A	CCAGACGGTGCGCAGCAA		
mutant				

Table 3. Genotype of NoVs and HBGA profile of infected individuals.

Sample	NoV Genotype	Diarrhoea	ABO/ Rh	Lewis	Secretor status	PCR mut G428A	PCR mut Lewis
Sapê Q254 ¹	GII.4	S	A+	a-b+	<i>Se</i>	<i>SeSe</i>	<i>LeLe</i>
Sapê Q225	GII.4	S	O+	a-b+	<i>Se</i>	<i>SeSe</i>	<i>LeLe</i> ⁵⁹
Sapê Q352	GII.4	S	ND	ND	ND	ND	ND
Sapê Q323	GII.12	S	A+	a-b+	<i>Se</i>	<i>SeSe</i>	<i>LeLe</i>
Sapê Q325	GII.12	S	A+	a-b+	<i>Se</i>	<i>SeSe</i>	<i>LeLe</i>
Sapê Q326	GII.12	S	A+	a-b+	<i>Se</i>	<i>SeSe</i>	<i>LeLe</i> ⁵⁹
Sapê Q322 ²	GI. 3+ GII.12	S	O+	a-b+	<i>Se</i>	<i>SeSe</i>	<i>LeLe</i> ^{202,314}
Sapê Q230	GI.3	S	O+	a-b-	<i>Se</i>	<i>SeSe</i>	<i>LeLe</i> ⁵⁹
Sapê Q229	GII.?	S	O+	a-b+	<i>Se</i>	<i>SeSe</i>	<i>LeLe</i>
Sapê Q174	GII.?	S	B+	a-b-	<i>Se</i>	<i>SeSe</i>	<i>LeLe</i> ⁵⁹
Sapê Q304 ²	GII.4	S	B+	a-b+	<i>Se</i>	<i>SeSe</i>	<i>LeLe</i> ^{202,314}
Sapê Q028	GII.?	S	A+	a-b+	<i>Se</i>	<i>SeSe</i>	<i>LeLe</i>
Sapê Q278	GII.6	N	A+	a-b-	<i>Se</i>	<i>SeSe</i>	<i>LeLe</i> ⁵⁹
Sapê 95	GII.6	N	O+	a-b+	<i>Se</i>	<i>SeSe</i>	<i>LeLe</i> ^{202,314}
Sapê Q355	GII.?	N	A+	a-b+	<i>Se</i>	<i>Sese</i> ⁴²⁸	<i>LeLe</i>
Sapê Q329	GI.?	N	O+	a+b-	<i>se</i>	<i>se</i> ⁴²⁸ <i>se</i> ⁴²⁸	<i>LeLe</i> ^{202,314}
Q51*	GI.4	S	ND	ND	ND	ND	ND
Q151*	GII.6	S	ND	ND	ND	ND	ND
Q220*	GI.1	N	ND	ND	ND	ND	ND

1 – Q254 is the same child as Q028 (specimens obtained 6 months apart). 2- Sequences smaller than 200 bp, sorted by Blast / NCBI.

*Samples obtained at the same period of the study from children of neighboring communities, not characterized as Quilombola. *Se* - secretor / *se* - non secretor / *Le* – Lewis wild-type allele / *le* – Lewis null allele. *N* - asymptomatic and *S* - symptomatic.

Table 4. Mutations found in exon 2 of the FUT2 gene of people from different continents and of the population studied.

BGMUT ID	Geographic origin	40	171	216	357	428	739	960	Reference
301	reference	A	A	C	C	G	G	A	1*
313, 317, 1018	Africa	G	G	T	T	A	A	G	1*
329, 801, 949	Asia		G	T	T	A	A	G	1*
1001, 1004, 1132	Europe		G	T	T	A	A	G	1*
	Brazil	G	G	T	T	A	A	G	2*

1* - Adapted from BGMUT [50].

2*- This study.

DIVERSITY OF HAdV TYPES IN FECES OF BLACK CHILDREN FROM QUILOMBOLA COMMUNITIES, SOUTHEAST BRAZIL

VICENTINI, F^{1,2,*}; DENADAI, W¹, GOMES, YM³; BARREIRA, DMPG³; PORTES, SAR⁴; XAVIER, MPTP⁴; MIAGOSTOVICH, MP⁴; LEITE, JPG⁴; SPANO, LC³

¹ Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, Espírito Santo, Brazil. 29932-540.

² Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil. 29043-900.

³ Departamento de Patologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil. 29043-900

⁴ Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. 21040-900.

*Tel.: +55 27 33121531, fax +55 27 33121510, e-mail: fernandovicentini@ceunes.ufes.br.

Number of words in the Abstract and in the text respectively: 250 and 2498.

ABSTRACT

Background. Adenoviruses (HAdV) have long been associated with diarrhea, but to establish a causal relationship with different types has been difficult due to the long asymptomatic stool shedding of certain HAdV types after respiratory infection. **Objectives.** Perform the molecular characterization of HAdV excreted in the feces of black children that inhabit Quilombola communities. **Study design.** In order to characterize the types of HAdV, the hexon gene was amplified by PCR (nt 21-322), analyzed with *SaI* restriction endonuclease and sequenced. **Results.** Between August 2007 and May 2010, 212 fecal samples were obtained from 133 (62.7%) children with (symptomatic) and 79 (37.3%) without (asymptomatic) diarrhea. The overall frequency of positivity was 27.8% (59/212), with 30.1% (40/133) and 24.1% (19/79) among the symptomatic and asymptomatic children, respectively. Thirty three samples of the symptomatic cases belonged to the following species: 3 (9.1%) A, 6 (18.2%) B, 18 (54.5%) C, 2 (6.1%) D, 4 (12.1%) F; E and G were not found. Among the C

species, types 1, 2, 5 and 6 were found. **Conclusions.** The HAdV-A and HAdV-F species accounted for approximately 20% of the total of the HAdV types and infected only children up to 5 years of age and 70% of these samples were present in the stools of symptomatic children. The HAdV-F41 was excreted equally between symptomatic and asymptomatic. This is the first study in Brazil that addresses HAdV in Quilombola children and the molecular characterization of all strains as well as highlight the highest frequency and diversity of HAdV.

Keywords: Human Adenovirus, Quilombola children, gastroenteritis, HAdV-A, HAdV-F.

BACKGROUND

Gastroenteritis of infectious etiology remains an important cause of morbidity in the human population worldwide, and is responsible for 800.000 deaths per year (WHO 2013). Diarrhea and vomiting associated with a lack of access to primary health care and supportive treatment for dehydration can lead to serious clinical consequences, especially in young children and infants in developing countries^{1,2,3}. The main infectious agents responsible for human enteric infections include viruses (enteric adenovirus, astrovirus, norovirus, rotavirus) and bacterial agents⁴.

Human adenoviruses (HAdVs) belong to the genus *Mastadenovirus* of the *Adenoviridae* family. These viruses have been characterized and classified according to their immunochemical properties, nucleic acid similarities, penton, hexon and fiber protein characteristics, biological properties and phylogenetic analysis^{5,6}. HAdVs have traditionally been classified into species and serotypes and correlated with genotypes, which have been determined by Restriction Fragment Length Polymorphism techniques (RFLP)⁷. The recombination phenomena and the gene diversity lead to a proposal of exclusive classification into types obtained from genome sequencing using a triplet nomenclature P, H and F (referring to penton, hexon and fiber coding regions)^{8,9}. According to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) there are presently 52 different HAdV types grouped into the seven species A to G⁶. However, the

Human Adenovirus Working Group has included candidates up to the HAdV-65¹⁰ and recently, a novel HAdV-D67, was identified from diarrheal feces of six children in Bangladesh¹¹.

HAdVs show different organ tropisms, considered species and specific serotypes that infect humans of all age groups and are significant pathogens. These pathogens can cause a wide range of clinical diseases, such as: epidemic keratoconjunctivitis (HAdV-D8, HAdV-D19, and HAdV-D37)^{12,13}, acute respiratory disease (HAdV-B3, HAdV-E4, HAdV-B7, HAdV-B14, and HAdV-B21)¹⁴ and acute gastroenteritis (HAdVA31, HAdV-F40, HAdV-F41, and HAdV-G52)¹⁵. The species HAdV-A31 and F40 and F41 are primarily associated with acute gastroenteritis, whereas HAdV-C2, C5^{15,16}, HAdV-B3¹⁵, HAdV-G52¹⁷ and HAdV-D8, D65 and D67^{11,15} can be associated with gastroenteritis. The occurrence of unusual types in what may be considered improbable sites in immunodeficient individuals has shown an increased tropism, such as the detection of HAdV-B7 and HAdV-C5 in stool samples¹⁶.

Gastroenteritis associated with HAdV develops after an incubation period of 8-10 days, and diarrhoea is the most prominent symptom. Stools are watery and non-bloody, and diarrhoea continues for seven to eight days. Vomiting occurs one to two days after the onset of diarrhoea in about four fifths of the patients but is usually mild and lasts for only about two days. Fever also occurs in 40-90% of patients with a mean duration of two to three days¹⁸⁻²¹.

This is the first study specifically involving a black, rural population in Brazil infected with HAdV. This population consists of descendants of former African slaves, who live in semi-isolated communities, called "Quilombola Communities", which are even today underserved communities with poor sanitary conditions, conducive to gastrointestinal diseases^{22,23}.

OBJECTIVES

The aim of this study was to characterize the genetic diversity of HAdV types in stools of symptomatic and asymptomatic children up to 11 years old, who are residents of the Quilombola Communities in the Espírito Santo State, Southeastern Brazil.

STUDY DESIGN

This is a descriptive study with black children up to 11 years old, who are descendants of slaves and who live in Quilombola Communities. These communities are predominantly agricultural, and are located in a semi-isolated rural area, known as North Sapê, in the North of Espírito Santo State, Southeast Brazil. Today there are 30 communities, with an estimated population of more than 3,600 people in 950 residences, connected by dirt roads of very difficult access. The communities lie at a distant of between 6.21 mi (10 km) and 18.64 mi (30 km) from urban centers and from each other.

Due to these difficulties, systematic visits, active searches and phone calls were made concerning any episode of diarrhea to ensure the collection of samples. Diarrhea was defined as three or more evacuations in a 24-h period.

This study was approved by the Ethics Research Committee of the Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo (129/06) and a Statement of Consent was obtained from the guardians and from the children themselves, whenever appropriate.

Fecal specimens

A total of 212 stool samples were obtained from children up to 11 years old with (symptomatic) and without diarrhea (asymptomatic), between August 2007 and May 2010.

Adenoviruses detection and type characterization

Viral nucleic acid was extracted from a 10% fecal suspension in Tris-calcium by using a guanidine isothiocyanate and silica method, as previously described²⁴.

The detection of HAdV was made by PCR followed by a nested PCR as described by Allard et al. (2001)⁷. Ten microliters of nucleic acid were added to a final reaction volume of 50 µl containing 1.5 mM MgCl₂, 200 mM of each dNTP, 10 pmol of each primer (hex1deg/hex2deg), 5 U of Platinum[®] Taq DNA polymerase (InvitrogenTM, Brazil) and reaction buffer (20 mM Tris HCl pH 8.4 and 50 mM KCl). Amplification was performed as described by Allard et al.

(2001)⁷, with modifications²⁵. The amplification product (301 bp) obtained was observed after electrophoresis in agarose gel 1.5% stained with ethidium bromide, in a DNR Bio-Imaging System MiniBIS Pro[®] (Jerusalem, Israel). PCR positive samples were diluted (1/100 in DNase/RNase free H₂O) to carry out nested PCR and five microliters of this solution were added to a final volume of 50 μ l containing 1.5 mM MgCl₂ (50 mM), 200 μ M of each dNTP, 10 pmol of each primer (Nehex3deg and Nehex4deg), 5 U of Platinum[®] Taq DNA polymerase (InvitrogenTM, Brazil) and reaction buffer (20 mM tris HCl pH 8.4 and 50 mM KCl). Amplification was performed in a cycle of 94°C for 5 min followed by 35 cycles of 94°C for 20 sec, 60°C for 20 s, 72°C for 30 seconds and one cycle of 72°C for 7 min, as described by Allard et al. (2001)⁷, with modifications²⁵. All reactions were conducted in a Veriti 96[®] thermocycler (Applied Biosystems). The amplification product (171 bp) obtained was observed in a DNR as previously described.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Samples that were positive in the first PCR reaction were used in RFLP as described by Allard et al. (2001)⁷ with modifications as follows: 2 – 4 μ l of the DNA amplified fragment (301 bp) were added to 8 μ l of diethylpyrocarbonate treated water, 3 μ l of 10X Bgl II buffer (1M NaCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM β -mercaptoethanol)²⁶ and 5 U of restriction enzyme *Sa*I, which discriminates F and non-F species. After incubation at 37°C overnight, the enzymatic digestion product was resolved in agarose gel 2% electrophoresis, stained with ethidium bromide, and observed in a DNR as previously described.

Sequencing

Sequencing was performed with a pair of primers⁷ that hybridize between bases in the positions 21 and 322 among 2907 of the *hexon* gene encoding region²⁷. Amplicon purification (301 bp fragment) was performed using the QIAquick[®] kit (Qiagen) and sequenced using the commercial kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA). Sequences were aligned using the BioEdit Sequence[®] Alignment Editor version 7.0.9.0, deposited in the

GenBank database and then compared with sequences of Brazilian and reference samples of each genotype. A phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-joining method using the MEGA program version 5.10, and the genetic distance was calculated with the Kimura 2 parameter model, using 2,000 pseudo-replicates.

Nucleotide sequences obtained in this study were submitted to the National Center for Biotechnology Information (Gen Bank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and received the following accession numbers: HAdV-A12 Sape Q542-KF432180; HAdV-A31, Sape Q0115-KF432189 and Sape Q625-KF432180; HAdV-F40, Sape Q003-KF432187; HAdV-F41, Sape Q074-KF432186, Sape Q077-KF432185, Sape Q237-KF432184, Sape Q368- KF432183, Sape Q372-KF432182 and Sape Q386-KF432181.

RESULTS

HAdV Detection

The distribution of stool collection from symptomatic and asymptomatic children during the years 2007-2010, is grouped bimonthly, and the frequency of positive HAdV is shown in Figure 1.

Out of the 212 samples analyzed for the presence of HAdV, 133 (62.7%) were from symptomatic children and 79 (37.3%) from asymptomatic children. The overall frequency of positivity was 27.8% (59/212), with 30.1% (40/133) and 24.1% (19/79) among symptomatic and asymptomatic children, respectively (Table 01). The positive samples were equally distributed among age groups (Table 01).

HAdV typing

The 59 HAdV cases were typed by RFLP and/or sequencing techniques that classified, respectively, 23% (12/50) and 14% (7/52) as F species (Table 2).

Of the 12 samples classified as F species by RFLP, 2 were not sequenced and three others showed different results when sequenced, in fact they belonged to the species B and C.

Of the nine samples typed exclusively by RFLP, five were in symptomatic children: 1 HAdV-F, 2 HAdV-A or B, 2 HAdV-C or D or E and; four in asymptomatic children: 1 HAdV-F and 3 HAdV-C or D or E (Table 02).

The partial sequencing of hexon showed that strains found in the stools of all children belonged to the species A (6%), B (14%), C (54%), D (12%) and F (14%) (Table 2) (Fig.02).

Among the symptomatic children, 33 sequenced samples were: HAdV-A 3 (9.1%), HAdV- B 6 (18.2%), HAdV-C 18 (54.5%) (44.4% HAdV-C1), HAdV-D 2 (6.1%), HAdV-F 4 (12.1%); HAdV-E and HAdV-G were not found.

The enteric species of HAdV-A and HAdV-F were found in 10 samples, 70% of which were from symptomatic children and 30% from asymptomatic children; all were children under 5 years of age.

DISCUSSION

The overall frequency of HAdV found in this study in children of Quilombola communities, without discrimination of enteric species, was far superior to other studies in Brazil that ranged from 2% to 11%^{25,28,29}. Similar studies with diarrhea in communities performed in the States of Rio de Janeiro Minas Gerais and Paraná, Southeast and South Brazilian regions, found an HAdV prevalence of 4.8%³⁰. On the outskirts of Salvador Bahia, Northeastern region, the prevalence was even lower (2.8%)²⁵. In hospitalized children in the state of São Paulo (Southeast region) the prevalence of HAdV was 10% and 11.4% in children with diarrhea and in a control group, respectively²⁸. In the North region (Rondônia State), Magalhães et al (2007)²⁹ found a prevalence of 6.4% in symptomatic children and 1.7% asymptomatic. Similarly, frequencies below 4% were found in hospitalized children in the Midwest region (Mato Grosso do Sul state)³¹.

What draws attention to the higher prevalence in our study, regardless of the region in Brazil, which has a large geographic area, or if the child is hospitalized or not, is the differentiated rural and black population of the study. In a similar population from Northern Ghana, HAdV was detected, in stools, in 27.6% of the symptomatic cases and 31.5% of the asymptomatic cases³²; interestingly, these

results are compatible with ours. However in other black people communities, Basu et al, (2003)³³, working in South Africa, found the enteric HAdV (types 40 and 41) in 2% of the samples and the remaining 5.8% of HAdV positive samples were non-enteric HAdV.

This study also revealed a high prevalence for enteric HAdV among the community children, at least three times higher than that observed in other studies, independent of the children being hospitalized or not^{25,31,33}.

The age group most affected and the diversity of species and types found by us in the stools has been reported in other studies in Brazil^{25,29,30,34,35}.

These data show the necessity of HAdV typing found in stools in order to clarify the excretion of each type and their participation as etiological agents of diarrhea in each study. The results obtained in the present study with partial sequencing of *hexon* gene showed that 30% of the samples were equivocally classified as F species when RFLP was used as the typing method. This is not surprising because according to Ariga et al. (2005)⁸ a misdiagnosis may occur when restriction enzyme or serotyping is used as the typing method.

The detection of non-enteric HAdV in stools has been common and may be due to factors such as asymptomatic infections or even, recent adjustments to new anatomical niches³⁶. The T cells of the sub-mucosa of the ileum, rectum and colon can be colonized by HAdV B, C or E which may be considered to be part of the normal flora³⁶. Persistent enteral infections with HAdV following the healing of upper respiratory tract infections (symptomatic or not) in infants and children have been well documented^{37,38}. Up to 15% of cases were found to excrete HAdV in the stools for periods ranging from three months to one year following the initial infections.

The challenge is to assess whether the classification by the characteristics of a single gene or part of it³⁹ is sufficient to maintain the current insight into the tissue tropism and the type-specific association for different diseases. Only a classification through the complete sequencing of the genes *hexon*, *penton* and *fiber*⁹ such as was done for the newly described HAdV-D67 (P-New / H9 / F25)¹⁰ would actually show if there is a specific tissue tropism type. Also the role of recombination in the adaptations and / or exchange of tissue tropism

and potential to cause injury to other tissues and thus be associated with other new diseases as proposed by Walsh et al (2009)⁴⁰ must be studied further.

In conclusion, this study highlighted a very high frequency of HAdV in the stools of Quilombola children and a great diversity of species and types, including the classic diarrhea agents and other types associated to other diseases. The C species was the one most frequently found and was represented by the types 1, 2, 5 and 6. HAdV-A and HAdV-F species accounted for approximately 20% of the total HAdV found and infected only children up to 5 years of age; most of them (70%) were symptomatic children. HAdV-F41 was equally present in the feces of healthy and sick children. This is the first study in Brazil addressing the molecular characterization of all HAdV strains found in stools and also the first concerning HAdV infections in Quilombola children.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the children and their tutors, the Community Health Agents and Leaders, the Municipal Health Department of São Mateus and Conceição da Barra Municipalities.

Funding: This study was supported with funds from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), Foundation for Research Support of the State of Espírito Santo (FAPES), Oswaldo Cruz Institute (IOC-PROEP/CNPq), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ). Fernando Vicentini is a doctoral student in the Graduate Program in Infectious Diseases (PPGDI), Federal University of Espírito Santo, and received a fellowship from Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for development of part of these studies at INSERM/CNRS/Université de Nantes, France. Fernando Vicentini also has a fellowship from CNPq for the development of part of these studies at Oswaldo Cruz Institute/Oswaldo Cruz Foundation (IOC/FIOCRUZ). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Ethical approval: Ethics Research Committee of the Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo (129/06).

REFERENCE

- 1- Guerrant RL, Kosek M, Moore S, Lorntz B, Brantley R, Lima AA. Magnitude and impact of diarrheal diseases. *Arch Med Res* 2002; 33: 351-5.
- 2- Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull WHO*. 2003; 81: 197-204.
- 3- Clark B and McKendrick M. A review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17:461-9.
- 4- Girard MP, Steele D, Chaignat CL, Kieny MP. A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine* 2006; 24:2732-50.
- 5- Rux JJ and Burnett RM. Adenovirus structure. Review. *Hum gene therapy* 2004; 15(8):1167-76.
- 6- King A, Lefkowitz E, Adams M, Carstens E. 2011. eds. *Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. San Diego: Academic Press.
- 7- Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2):498-505.
- 8- Ariga T, Shimada Y, Shiratori K, Ohgami K, Yamazaki S, Tagawa Y. Five New Genome Types of Adenovirus Type 37 Caused Epidemic Keratoconjunctivitis in Sapporo, Japan, for More Than 10 Years *J Clin Microbiol* 2005; 43(2):726–32.
- 9- Seto D, Chodosh J, Brister JR, Jones MS. Letters to the Editor Using the Whole-Genome Sequence To Characterize and Name Human Adenoviruses *J Virol* 2011; 85(11):5701–2.
- 10- Matsushima Y, Shimizu H, Kano A, Nakajima E, Ishimaru Y, Dey SK et al. Novel Human Adenovirus Strain, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(5): 846-8.

- 11- Matsushima Y, Shimizu H, Kano A, Nakajima E, Ishimaru Y, Dey SK et al. Genome sequence of a novel virus of the species human adenovirus D associated with acute gastroenteritis. *Genome Announc.* 1(1):e00068-12. 2013. doi:10.1128/genomeA.00068-12.
- 12- Robinson CM, Shariati F, Gillaspay AF, Dyer DW, Chodosh J. Genomic and bioinformatics analysis of human adenovirus type 37: new insights into corneal tropism. *BMC Genomics* 2008; 9: 213.
- 13- Robinson CM, Shariati F, Zaitshik J, Gillaspay AF, Dyer DW, Chodosh J. Human adenovirus type 19: Genomic and bioinformatics analysis of a keratoconjunctivitis isolate. *Virus Res* 2009; 139: 122–9.
- 14- Dingle JH, Langmuir AD. Epidemiology of acute, respiratory disease in military recruits. *Am Rev Respir Dis* 1968; 97: Suppl 1–65.
- 15- Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H et al. Molecular epidemiology of Adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiol Immunol* 2005; 49:121–8.
- 16- Hierholzer, J. C. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5:262–74.
- 17- Jones MS, Harrach B, Ganac RD, Gozum MMA, dela Cruz WP, Riedel B et al. New adenovirus species found in patient presenting with gastroenteritis. *J Virol* 2007; 81: 5978–84.
- 18- Richmond SJ, Caul EO, Dunn SM, Ashley CR, Clarke SKR, Seymour NR. An outbreak of gastroenteritis in young children caused by adenoviruses. *Lancet* 1979; i: 1178-80.
- 19- Yolken RH, Lawrence F, Leister F, Takiff HK, Strauss SE. Gastroenteritis associated with enteric type adenovirus in hospitalised infants. *J Pediatr* 1982; 101:21-6.
- 20- Uhnou I, Wadell G, Svensson L, Johansson ME. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol* 1984; 20:365-72.
- 21- Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Arrobio JO, Jefferies BC, Parrott RH. Adenoviruses and paediatric gastroenteritis. *J Infect Dis* 1985;151:437-43.

- 22- Vicentini F, Denadai W, Gomes YM, Rose TL, Ferreira MSR, Le Moullac-Vaidye B et al. Molecular characterization of norovirus and HBGA from infected Quilombola children in Espírito Santo state, Brazil. PLoS ONE 8(7): e69348. 2013.doi:10.1371/journal.pone.0069348.
- 23- Aragão GC, Mascarenhas JDP, Kaiano JHL, Lucena MSS, Siqueira JAM, Fumian TM et al. Norovirus Diversity in Diarrheic Children from an African-Descendant Settlement in Belém, Northern Brazil. PLoS ONE 8(2):e56608. 2013. doi:10.1371/ journal.pone.0056608.
- 24- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 1990; 28(3): 495–503.
- 25- Pereira Filho E, Faria NRC, Fialho AM, Assis RS, Almeida MMS, Rocha M et al. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. J Med Microbiol 2007; 56:313-9.
- 26- Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. J Infect Dis 1994; 70:1077–85.
- 27- Akusjarvi G, Alestrom P, Pettersson M, Lager M, Jörnvall H, Pettersson U. The Gene for the Adenovirus 2 Hexon Polypeptide. J Biol Chem 1984; 259(22):13976-9.
- 28- Hársi CM, Rolim DP, Gomes SA, Gili, AE, Stewien, KE. Adenovirus genome types isolated from stools of children with gastroenteritis in São Paulo, Brazil. J Med Virol 1995; 26:1783-6.
- 29- Magalhães GF, Nogueira PA, Grava AF, Penati M, Silva LHP, Orlandi PP et al. Rotavirus and adenovirus in Rondônia. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007;102(5):555-7.
- 30- Soares CC, Volotão EM, Albuquerque MC, Da Silva FM, De Carvalho TR, Nozawa CM et al. Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. J Clin Virol 2002; 23:171-7.

- 31- Andreasi MSA, Cardoso DDP, Fernandes SM, Tozetti IA, Borges AMT, Fiaccadori FS et al. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103(7):741-4.
- 32- Reither K, Ignatius R, Weitzel T, Seidu-Korkor A, Anyidoho L, Saad E et al. Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics *BMC Infect Dis* 2007; 7:104 doi:10.1186/1471-2334-7-104.
- 33- Basu G, Rossouw J, Sebunya TK, Gashe BA, de Beer M, Dewar JB et al. Prevalence of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection in young children with gastroenteritis in Gaborone, Botswana. *East Afr Med J* 2003; 80:652-5.
- 34- Gomes SA, Candeias JAN, Monteiro SP, Pereira HG, Niel C. New Genome Types of Adenovirus Types 1,2 and 5 Isolated from Stools of Children in Brazil. *J Clin Microbiol* 1989; 27 (5):1022-6.
- 35- Freitas ERL, Borges AMT, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Cardoso DDP. Molecular characterization of adenovirus detected from fecal samples obtained from children in the Central West region of Brazil. *Arch Virol* 2010; 155:1693–6.
- 36- Roy S, Calcedo R, Medina-Jaszek A, Keough M, Peng H, Wilson JM. Adenoviruses in Lymphocytes of the Human Gastro-Intestinal Tract. *PLoS ONE* 6(9): e24859. 2011. doi:10.1371/journal.pone.0024859.
- 37- Fox JP, Brandt CD, Wassermann FE, Hall CE, Spigland I, Kogon A et al. The virus watch program: a continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families. VI. Observations of adenovirus infections: virus excretion patterns, antibody response, efficiency of surveillance, patterns of infections, and relation to illness. *Am J Epidemiol* 1969; 89: 25–50.
- 38- Fox JP, Hall CE, Cooney MK. The Seattle Virus Watch. VII. Observations of adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 1977; 105: 362–86.
- 39- Ebner K, Pinsker W and Lion T. Comparative Sequence Analysis of the Hexon Gene in the Entire Spectrum of Human Adenovirus Serotypes: Phylogenetic, Taxonomic, and Clinical Implications. *J Virol* 2005; 79(20): 12635-42.

40- Walsh MP, Chintakuntlawar A, Robinson CM, Madisch I, Harrach B, Hudson NR et al. Evidence of Molecular Evolution Driven by Recombination Events Influencing Tropism in a Novel Human Adenovirus that Causes Epidemic Keratoconjunctivitis. PLoS ONE 4(6): e5635. 2009. doi:10.1371/journal.pone.0005635.

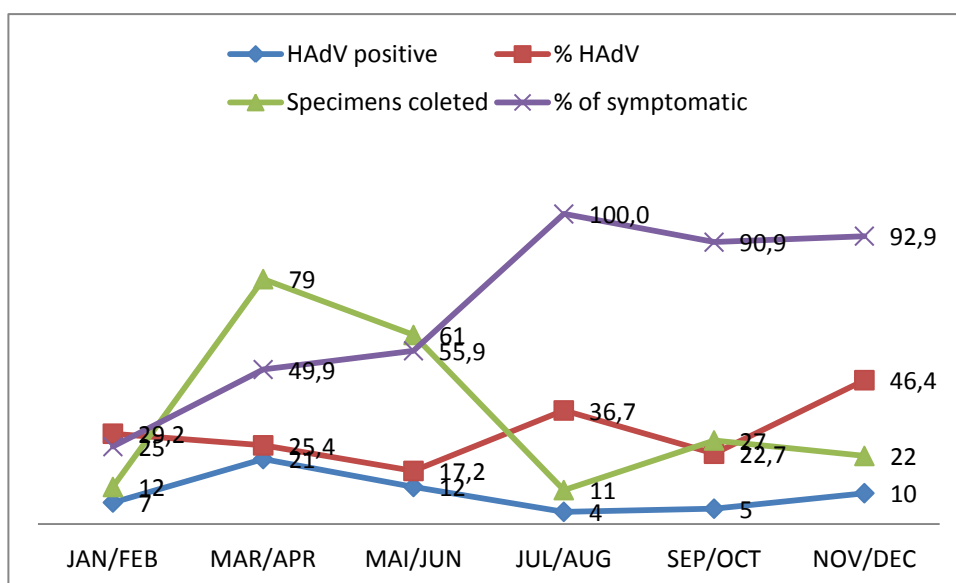


Figure 01. Distribution of cases, percentage of positivity for HAdV, compared to the total of specimens collected and total of symptomatic cases, on the basis of months from August/2007 to May/2010.

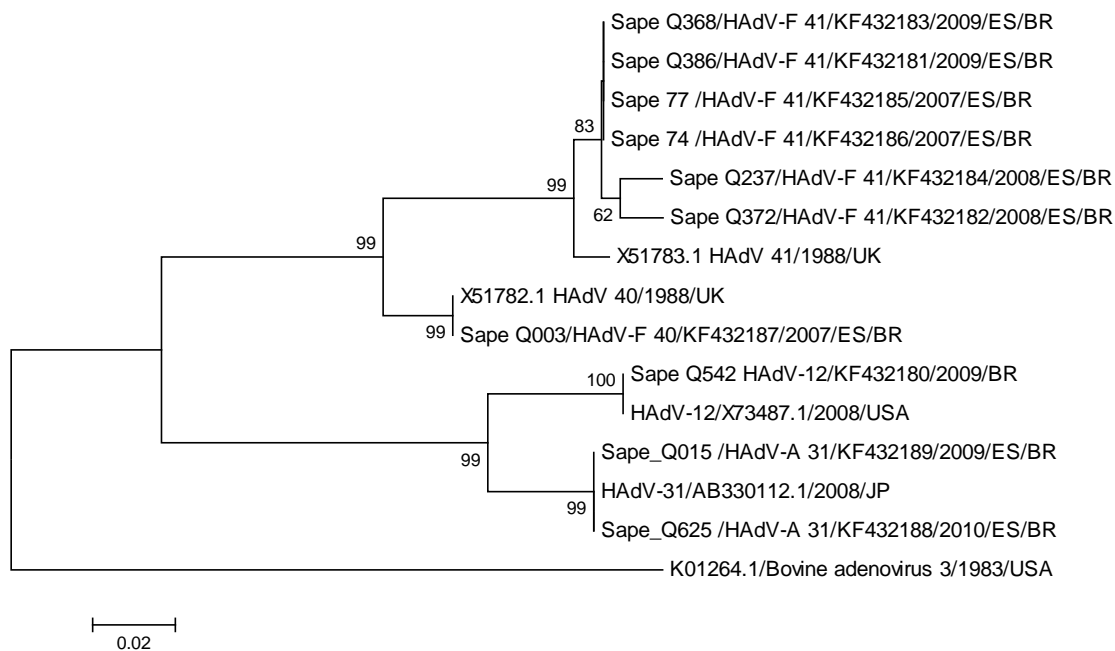


Figure 02. The phylogenetic tree of the positive samples of HAdV-A and HAdV-F. The phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-joining method based on the partial nucleotide sequence of the hexon capsid protein. Highlighted strains identified by "Sapê" (KF432180-KF432189) originated in fecal samples from "Quilombola" children and were analyzed along with the prototype HAdV-A12, 31 and HAdV-F40 and 41 taken from the "GenBank." All strains were identified by genotype / accession number / year / origin. The bovine adenovirus BAdV-B3/K01264.1/1983/USA was added as a reference group. Values of "Bootstrap (2,000 replicates) are shown at the junction of the branches.

Table 01. Distribution of positive HAdV cases among age groups.

HAdV	Age of children			Total % (n/total)
	% (n/total)			
	0-2 y	>2 y-5 y	>5 y-10 y	
Symptomatic	32.6 (14/43)	35.5 (22/62)	14.3 (4/28)	30.1 (40/133)
Asymptomatic	30 (3/10)	32.4 (12/37)	12.5 (4/32)	24.1 (19/79)
Total	32.1 (17/53)	34.3 (34/99)	13.3 (8/60)	27.8 (59/212)

Table 02. Relationship of HAdV species characterized by RFLP among the types and species characterized by gene sequencing.

Species	Sequence		Group*		RFLP
	Type		Symp	Asymp	
A	12		1	0	C/D/E
	31		2	0	1 (C/D/E); 1 (A/B)
B	3		6	1	1 (F); 6 (A/B)
C	1		8	5	1 (F); 1 (A/B); 11 (C/D/E)
	2		5	3	1 (F); 4 (C/D/E); 3 (NT)
	5		1	1	1 (C/D/E); 1 (NT)
	6		4	0	4 (C/D/E)
D	17/19		0	1	C/D/E
	30		2	0	1 (C/D/E); 1 (NT)
	42/43/47/38		0	1	NT
	43/67/64		0	1	C/D/E
	48		0	1	C/D/E
F	40		1	0	F
	41		3	3	6 (F)

*Symptomatic and asymptomatic; NT - Samples sequenced, but not tested by RFLP

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Primeiramente se faz necessário registrar e explicitar a Tecnologia Social desenvolvida através da realização deste trabalho.

Nestes últimos 6 anos de contato com as diferentes comunidades Quilombolas dos municípios de São Mateus e Conceição da Barra, foram percorridos certamente mais de 5 mil km por estradas não pavimentadas para acompanhar um pouco da vida naqueles remanescentes de Quilombos.

Desde o primeiro contato com cada liderança, foram ouvidas as diferentes demandas sociais, culturais e principalmente de saúde apresentadas por pessoas de todas as faixas etárias, além do tema deste estudo.

Apesar de toda limitação operacional, típica de uma Universidade Federal e pública, se procurou orientar, participar e estabelecer parcerias no sentido de levar respostas e se possível soluções.

Assim, outros grupos da UFES, ONGs e o próprio corpo técnico dos municípios interagiram e receberam as diferentes demandas, tendo como retorno algumas ações específicas.

Apesar de muito planejamento, infelizmente ainda não foi possível atender ao que pareceu ser a maior demanda: estudar e tratar o glaucoma, presente e imperativo entre muitas das famílias visitadas.

Não há nada mais frustrante e instigador ao pesquisador que ouvir um depoimento de uma jovem com seus 20 anos, como: "...minha avó está cega há muitos anos, penso que desde que eu nasci, pois só a conheci assim. Meu pai também está com glaucoma em fase avançada. Eu cuido deles com a clareza que um dia serei eu a perder a visão...".

Parcerias foram estabelecidas com o setor responsável na faculdade de medicina da UFES e com a principal indústria extratora de celulose e assim responsável direta pelo plantio de eucalipto em toda a região. Indústria essa que nas últimas décadas entrou em conflito social várias vezes com os Quilombolas, que pela absoluta falta de esperança e sem terras para cultivo, foram acusados de atear fogo nas florestas de eucalipto. Assim, atingindo financeiramente e também a imagem da indústria, mas acima de tudo,

conseguindo madeira em quantidade para a fabricação do carvão vegetal, fonte de renda para a grande maioria das famílias que não cultivam a terra.

Neste momento há um projeto depositado por nós junto à Direção de tal indústria, no sentido de implantar um programa permanente para o diagnóstico e tratamento do glaucoma entre os Quilombolas da região. Considerando que nos últimos anos a empresa que é grande exportadora e necessita de investimento social, tem feito algumas parcerias com essa população, há esperanças de finalmente atingir esse objetivo.

Outro aspecto importante aprendido pelo grupo ao visitar comunidades e casas, foi ver a absoluta receptividade tanto das lideranças, quanto dos populares sobre todas as propostas levadas a eles, fosse para a coleta de espécimes como fezes, sangue ou saliva, ou para a coleta de dados sociais.

Muitas vezes durante as visitas às comunidades para a coleta de material biológico, após o atendimento às crianças de até 11 anos, objeto do nosso estudo, formaram-se filas de pessoas, principalmente de idosos desejando "algum" tipo de atendimento de saúde. Estavam sempre à procura por um exame. Em parte explicado pelos exames parasitológicos realizados a todas as crianças, dando retorno imediato às famílias e ACS, porém ficou a convicção de que muitas daquelas pessoas nunca estiveram num consultório médico.

Aliás duas comunidades inteiras ficaram aguardando a implantação deste trabalho (nas proximidades de Angelim I e de Santa Maria), porém em função da extrema dificuldade de acesso, que incluía travessia obrigatória de rio, nunca o grupo chegou lá. Um marco negativo deste trabalho, porém com a consciência que em uma visita não seriam atendidas as demandas e que eram necessárias outras estruturas para realizar um atendimento adequado às expectativas daquelas pessoas e para entrar naquelas comunidades com dignidade.

Sobre os objetos de estudo deste trabalho, foram surpreendentes os resultados dos testes para rotavírus. Havia um bom sistema de detecção, com controles funcionando normalmente e portanto os resultados eram confiáveis. Além dos controles positivos, outras amostras de fezes de um estudo paralelo a este mostraram-se positivas quando analisadas simultaneamente por EGPA.

Contraditoriamente aos resultados da EGPA, os resultados do Elisa mostraram 6 amostras positivas. Essas amostras foram testadas por RT-PCR para os genes da VP4 e VP7, cujos resultados foram negativos.

Ainda assim, era esperada uma frequência diferente de zero para este que foi a principal causa de mortalidade infantil por diarreia viral no mundo todo e ao menos na África subsahariana e sul da Ásia continua sendo.

As ACS mais experientes relatam muitos casos de mortalidade infantil, atribuídas clinicamente aos rotavírus na região nas últimas décadas.

Essa aparente proteção dos Quilombolas aos rotavírus, sugere uma contingência imposta pela baixa densidade demográfica e pequeno trânsito de pessoas, principalmente nas comunidades mais isoladas.

Mesmo considerando a baixa cobertura vacinal para rotavírus naquelas comunidades mais distantes de UBS das áreas urbanas, não houve detecção de rotavírus, assim como nas comunidades localizadas geograficamente mais periféricas, logo, com acesso mais fácil às UBS, onde a cobertura vacinal é alta, chegando a 100% em alguns casos.

Desta forma explicação para a não detecção dos rotavírus pode ser aventada como um fenômeno composto: i) pela proteção imposta por uma barreira de imunizados pela vacinação; ii) pelo pequeno trânsito e, iii) possivelmente entre as crianças mais velhas, por imunidade adquirida em infecções anteriores a este estudo. Não havendo portanto, evidência de nenhum fator biológico associado ao hospedeiro, como a não susceptibilidade aos rotavírus. Até porque a diversidade de genótipos de NoV e de tipos de HadV que os acometeram, mostram claramente a alta susceptibilidade aos vírus entéricos.

Mesmo para os NoV e HAdV, com toda a diversidade comentada, a frequência de cada estirpe, foi sempre baixa, com um único surto por NoV GII.12, bem caracterizado na comunidade de Angelim I. Isso também permite a suposição de que o fator de proteção, se presente, foi físico, ou seja, a distância física e o isolamento das pessoas, imposta inclusive, pelas florestas de eucalipto.

Há de se considerar ainda o perfil comportamental e cultural, que mostra claramente a pequena interação entre comunidades, onde muitas vezes o principal deslocamento, é o das crianças que frequentam escolas. A vivência

diária das salas de aula nas escolas unidocentes seriam um fator de risco, porém essas escolas menores, estão inseridas em cada comunidade, evitando assim, o trânsito de crianças menores de 6 anos para fora de suas comunidades.

Estudo recente no semiárido brasileiro, com outras famílias também contempladas pelo programa "Brasil, um milhão de cisternas", mostrou que famílias que residem em casas com cisternas apresentaram menor incidência de diarreia que aquelas que se utilizam de outras fontes de água e não dispõem de cisternas. Esses dados corroboram com os resultados deste estudo, mostrando as cisternas como fator de proteção à veiculação hídrica dos vírus entéricos e de outros patógenos intestinais.

Há de se considerar ainda a ampla divulgação que foi dada a todos os problemas de saúde e diferentes agentes etiológicos encontrados nas fezes das crianças. Assim, parasitas, bactérias e vírus, foram caracterizados e cujos resultados foram levados a diferentes congressos de amplitude nacional. Este grupo esteve presente nos últimos anos em eventos das Sociedades Brasileiras de Microbiologia, de Parasitologia, de Medicina Tropical e de Virologia. Todo o material coletado, foi utilizado para a realização de 3 dissertações de mestrado, já concluídas com sucesso no PPGDI/Ufes e de Trabalhos de Conclusão de Curso, nos cursos de Enfermagem e Farmácia do centro Ceunes, da Ufes.

Além da divulgação científica, sempre houve o compromisso com a divulgação local, direcionados aos profissionais de saúde e às comunidades, através de reuniões sistemáticas que culminaram com o evento realizado no campus São Mateus da Ufes (Ceunes): I Encontro: Saúde das Populações Negras e Quilombolas. Uma outra forma de divulgação e de inserção de membros das comunidades no projeto, foi através do edital CNPq/FAPES/Pibic Jr, onde foram contemplados com bolsas de estudos, 5 alunos de ensino fundamental ou médio, pertencentes às comunidades, que puderam visitar a universidade semanalmente durante um ano e participar ativamente deste trabalho.

7 CONCLUSÕES

- Não foram detectados casos de infecção por RV ou AstV entre as crianças Quilombolas, sugerindo que possivelmente não houve circulação destes vírus naquelas comunidades no período estudado;
- A frequência de infecção por NoVs entre sintomáticos e assintomáticos foi semelhante às demonstradas nos estudos com outras populações, apesar das particularidades sócio-culturais dos Quilombolas;
- Foi observada a maior susceptibilidade aos NoVs entre os menores de 1 ano de idade, dado incomum para estes vírus;
- Os genótipos GI.1 e GI.4 foram descritos pela primeira vez no Brasil;
- As crianças Quilombolas foram infectadas por uma grande diversidade genética dos NoVs, porém não houve caracterização de nenhum perfil de proteção ou maior susceptibilidade de nenhum grupo sanguíneo específico entre os avaliados, ABO, estado secretor ou Lewis;
- A população negra Quilombola mostrou-se altamente susceptível à infecção por HAdVs;
- Foram detectados nas fezes, tanto os HAdVs entéricos, quanto outros que tipicamente infectam outros sítios anatômicos;
- Entre os HAdVs não-entéricos, os HAdV-C foram os mais frequentes e distribuídos entre os tipos 1, 2, 5 e 6;
- Os HAdV-A e HAdV-F, considerados entéricos, estiveram presentes em um quinto do total de casos de HAdVs;
- Os HAdVs entéricos infectaram exclusivamente crianças menores de 5 anos de idade e detectadas principalmente em crianças sintomáticas;
- Os HAdV-F41 estiveram igualmente presentes entre sintomáticos e assintomáticos;
- Apesar da alta frequência de infecção por diversos tipos de HAdVs e genótipos de NoV, não foi evidenciada qualquer diferença genotípica e/ou fenotípica na população estudada, que pudesse ser associada a um perfil específico da população estudada sobre resistência inata ou maior susceptibilidade a quaisquer dos vírus;

- Os estudos moleculares dos genes de *FUT-2* e *FUT-3* mostraram que a população negra Quilombola mantém as características tanto das populações Africanas, quanto aquelas presentes e comuns a todos os povos;

8 PERSPECTIVAS

Serão escritos 2 (dois) outros artigos científicos com os dados deste trabalho: i) Agentes virais, bacterianos e parasitários de diarreia em crianças Quilombolas do norte do ES, Brasil e ii) Filogenia molecular dos genes *Fut2* e *Fut3* dos negros Quilombolas do norte do ES, Brasil;

O ciclo de trabalho nas comunidades está encerrado, entretanto a partir do banco de amostras fecais é possível realizar novos experimentos.

Uma das linhas possíveis é a caracterização molecular das cepas de *Giardia spp.* encontradas e realizar a busca e caracterização de *Cryptosporidium spp.* em amostras de fezes das crianças que apresentaram diarreia.

Para os NoV e HAdV encontrados, há a possibilidade de ampliar as regiões sequenciadas até então. Considerando as últimas descobertas sobre recombinação entre os NoV, assim como com os HAdV, o sequenciamento completo dos genes ligados à adsorção viral, poderão explicitar as sequências de aminoácidos dos anti-receptores virais.

Especificamente para os HAdV, a sequência completa dos genes que codificam as estruturas hexon, penton e fibra permitiriam a classificação completa seguindo a proposta atual para estes vírus (H/P/F). Essa análise permitiria ainda avaliar de forma mais consistente a presença de todas as amostras consideradas até o momento como de origem não intestinal.

Há uma concepção de projeto aguardando a oportunidade de um edital de fomento visando o isolamento de todas as amostras de HAdV não intestinais em culturas de células de linhagem intestinal. A partir da replicação viral, teríamos o sequenciamento das regiões que codificam todas as estruturas envolvidas na adesão viral. Assim, poderemos concluir a respeito da infecção ou não de células intestinais para esses tipos que foram encontrados nas fezes das crianças Quilombolas.

Outras possibilidades: i) Avaliar as inconsistências dos resultados obtidos entre as técnicas de RFLP e o sequenciamento genético para a classificação dos HAdV e ii) Avaliar as inconsistências entre os resultados das técnicas utilizadas para detecção de RV, EGPA, EIE e RT-PCR.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Rahman, SZ. Isolation of DNA using salting-out procedure. **J Biochem Toxicol**, 1994;9:191-8.

Adah MI, Wade A, Taniguchi K. Molecular epidemiology of Rotaviruses in Nigeria: detection of unusual strains with G2P[6] and G8P[1] specificities. **J Clin Microbiol**, 2001;39 (11):3969-75.

Akusjarvi G, Alestrom P, Pettersson M, Lager M, Jörnvall H, Pettersson U. The Gene for the Adenovirus 2 Hexon Polypeptide. **J Biol Chem**, 1984; 259(22):13976-9.

Alain S, Denis F. Épidémiologie des diarrhées aiguës infectieuses em France et em Europe. **Arch pédiatrie**, 2007;14(Suppl 3):132-44.

Albert MJ, Faruque AS, Faruque SM, Sack RB, Mahalanabis D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. **J Clin Microbiol**, 1999;37(11):3458-64.

Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. **J Clin Microbiol**, 2001;39(2):498-505.

Andreas MSA, Cardoso DDP, Fernandes SM, Tozetti IA, Borges AMT, Fiaccadori FS *et al.* Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2008;103(7):741-4.

Aragão GC, Mascarenhas JDP, Kaiano JHL, Lucena MSS, Siqueira JAM, Fumian TM *et al.* Norovirus Diversity in Diarrheic Children from an African-Descendant Settlement in Belém, Northern Brazil. **PLoS ONE**, 8(2):e56608. 2013. doi:10.1371/ journal.pone.0056608.

Aragão GC, Oliveira DS, Santos MC, Mascarenhas JDP, Oliveira CS, Linhares AC *et al.* Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. **Rev Pan-Amaz Saúde**, 2010;1(1):149-58.

Araújo IT, Ferreira MS, Fialho AM, Assis RM, Cruz CM, Rocha M *et al.* Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol**, 2001;39(5):1999-2001.

Ariga T, Shimada Y, Shiratori K, Ohgami K, Yamazaki S, Tagawa Y. Five New Genome Types of Adenovirus Type 37 Caused Epidemic Keratoconjunctivitis in Sapporo, Japan, for More Than 10 Years **J Clin Microbiol**, 2005;43(2):726–32.

Armah GE, Pager CT, Asmah RH, Anto FR, Oduro AR, Binka F *et al.* Prevalence of unusual human rotavirus strains in Ghanaian children. **J Med Virol**, 2001;63(1):67-71.

Barreira DM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadovsky AD, Leite JP *et al.* Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. **J Clin Virol**, 2010;47(1):60-4.

Basu G, Rossouw J, Sebunya TK, Gashe BA, de Beer M, Dewar JB *et al.* Prevalence of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection in young children with gastroenteritis in Gaborone, Botswana. **East Afr Med J**, 2003; 80:652-5.

Benko M, Harrach B. Molecular evolution of adenoviruses. In: Doerfler W, Bo P, eds. Adenoviruses: Model and Vectors in Virus-Host Interactions. **Curr Top Microbiol Immunol**, 2003;272:3–35.

Bennett S, MacLean A, Miller RS, Aitken C, Gunson RN. Increased norovirus activity in Scotland in 2012 is associated with the emergence of a new norovirus GII.4 variant. **Euro Surveill**, 2013;18(2):pii=20349.

Bern C, Martines J, de Zoysa I, Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten year update. **Bull WHO**, 1992;70:705-14.

Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H *et al.* Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **J Infect Dis**, 1994; 70:1077–85.

Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Lüthi TM. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of the brands. **Appl Environ Microbiol**, 2002;68(4):1925-31.

Blanton LH, Adams SM, Beard RS, Wei G, Bulens SN, Widdowson MA *et al.* Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000. **J Infect Dis**, 2004;193(3):413-21.

Bon F, Fascia P, Dauvergne M, Tenenbaum D, Planson H, Petion AM, Pothier P. Prevalence of Group A Rotavirus, Human Calicivirus, Astrovirus, and Adenovirus Type 40 and 41 Infections among Children with Acute Gastroenteritis in Dijon, France. **J Clin Microbiol**, 1999;37(9):3055–8.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, 1990;28(3):495-503.

Boon D, J E Mahar, E J Abente, C D Kirkwood, R H Purcell, *et al.* Comparative evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period. **J Virol**, 2011;85:8656-66.

Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Arrobbio JO, Jefferies BC, Parrott RH. Adenoviruses and paediatric gastroenteritis. **J Infect Dis**, 1985;151:437-43.

Bridger JC. From filterable agents to virus genes: the discovery of viruses that cause diarrhea. **Vet J**, 2008;178(1):5-6.

Bucardo F, E Kindberg, M Paniagua, A Grahn, G Larson, *et al.* Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua. **J Med Virol**, 2009;81:728-35.

Bucardo F, Lindgren PE, Svensson L, Nordgren J. Low prevalence of rotavirus and high prevalence of norovirus in hospital and community wastewater after introduction of rotavirus vaccine in Nicaragua. **PLoS ONE**, 6:e25962. 2011.

Bull RA & White PA. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. **Trends in Microbiol**, 2011;19(5):233-40.

Cardoso DD, de Brito WM, Martins RM, Kitajima EW, Souza MP, Barbosa AJ *et al.* Presence of rotavirus and adenovirus in fecal samples of children with gastroenteritis, in the city of Goyania. **Rev Soc Bras Med Trop**, 1989;22(2):67-71.

Carlsson B, Kindberg E, Buesa J, Rydell GE, Lido'n MF, *et al.* The G428A Nonsense Mutation in FUT2 Provides Strong but Not Absolute Protection against Symptomatic GII.4 Norovirus Infection. **PLoS ONE** 4(5): e5593. 2009. doi:10.1371/journal.pone.0005593

Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, Fialho AM, de Assis Martins CM, Bóia MN *et al.* Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg Infect Dis**, 2009;15(1):95-7.

Carvalho-Costa FA, Assis RM, Fialho AM, Bóia MN, Alves DP, Martins CM *et al.* Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2006;101(3):291-4.

Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinjé J, Rácz ML. Genetic diversity of Norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo state, Brazil. **J Clin Microbiol**, 2006;44(11):3947-53.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/norovirus/hcp/clinical-overview.html> (Acessado em 01 de agosto de 2013c).

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Rotavirus home. <http://www.cdc.gov/rotavirus/index.html> (Acessado em 07 de agosto de 2013b).

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Global Diarrhea Burden Diarrhea: Common Illness, Global Killer. Stopping diarrhea. <http://www.cdc.gov/healthywater/global/diarrhea-burden.html#one>. (Acessado em 01 de agosto de 2013a).

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Managing acute gastroenteritis among children: oral rehydration, maintenance, and nutritional therapy. **MMWR**, 2003;52(16).

Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshita K, Honma S. Sapporo virus: history and recent findings. **J Infect Dis**, 2000;181(Suppl2):S303–S308.

Chor, D. Desigualdades em saúde no Brasil: é preciso ter raça. **Cad Saúde Pública**, 2013;29(7):1272-5.

Clark B, McKendrick M. A review of viral gastroenteritis. **Curr Opinion in Infect Dis**, 2004;17(5):461-69.

Corrêa, AA, Carratala A, Barardi CRM, Calvo M, Girones R, Bofill-Masb S. Comparative Inactivation of Murine Norovirus, Human Adenovirus, and Human JC Polyomavirus by Chlorine in Seawater. **Appl Environ Microbiol**, 2012;78(18):6450–7.

Cunha EMGP. Condicionantes da Mortalidade Infantil segundo Raça/cor no Estado de São Paulo, 1997-1998. Tese (Doutorado) UNICAMP, Campinas, S.Paulo, 2001.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M *et al.* Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **J Clin Microbiol**, 1994;32(6):1820-2.

De Grazia S, Giammanco GM, Colomba C, Cascio A, Arista S. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Italian children with gastroenteritis. **Clin Microbiol Infect**, 2004;10(11):1025-9.

Desai R, Oliveira LH, Parashar UD, Lopman B, Tate JE, *et al.* Reduction in morbidity and mortality from childhood diarrhoeal disease after species A rotavirus vaccine introduction in Latin America - a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 2011;106(8):907-11.

Dingle JH, Langmuir AD. Epidemiology of acute, respiratory disease in military recruits. **Am Rev Respir Dis**, 1968; 976:Suppl 1-65.

Domínguez A, Torner N, Ruíz L, Martínez A, Barrabeig I, Camps N *et al.* Aetiology and epidemiology of viral gastroenteritis outbreaks in Catalonia (Spain) in 2004-2005. **J Clin Virol**, 2008;43(1):126-31.

Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. **Nat Rev Microbiol**, 2010;8(3):231-41.

Dong J, Dong L, Méndez E, Tao Y. Crystal structure of the human astrovirus capsid spike. **PNAS**, 2011;108(31):12681-6.

Duizer, E.; Schwab, K.J.; Neill, F.H.; Atmar, R.L.; Koopmans, M.P.; Estes, M.K. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. **J. Gen. Virol.** 2004;85:79-87.

Ebner K, Pinsker W and Lion T. Comparative Sequence Analysis of the Hexon Gene in the Entire Spectrum of Human Adenovirus Serotypes: Phylogenetic, Taxonomic, and Clinical Implications. **J Virol**, 2005;79(20):12635-42.

Esona MD, Armah GE, Geyer A, Steele AD. Detection of an unusual human Rotavirus strain with G5P[8] specificity in a Cameroonian child with diarrhea. **J Clin Microbiol**, 2004;42(1):441-4.

Estes M. In Knipe DM *et al.*, eds. **Fields Virology**, ed. 4. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins CD-room, 2001.

Ferreira MSR, Xavier MPTP, Tinga ACC, Rose TL, Fumian TM, *et al.* Assessment of Gastroenteric Viruses Frequency in a Children's Day Care Center in Rio de Janeiro, Brazil: A Fifteen Year study (1994-2008). **PLoS ONE**, 7(3): e33754. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0033754.

Ferrer-Admetlla A, Sikora M, Laayouni H, Esteve A, Roubinet F, *et al.* A natural history of FUT2 polymorphisms in humans. **Mol. Biol. Evol**, 2009;26(9):1993-2003.

Fioretti JM, Ferreira MSR, Victoria M, Vieira CB, Xavier MPTP, *et al.* Genetic diversity of noroviruses in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2011;106(8):942-7.

Fox JP, Brandt CD, Wassermann FE, Hall CE, Spigland I, Kogon A *et al.* The virus watch program: a continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families. VI. Observations of adenovirus infections: virus excretion patterns, antibody response, efficiency of surveillance, patterns of infections, and relation to illness. **Am J Epidemiol**, 1969;89:25-50.

Fox JP, Hall CE, Cooney MK. The Seattle Virus Watch. VII. Observations of adenovirus infections. **Am J Epidemiol**, 1977;105 362–86.

Freitas ERL, Borges AMT, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Cardoso DDP. Molecular characterization of adenovirus detected from fecal samples obtained from children in the Central West region of Brazil. **Arch Virol**, 2010;155:1693–6.

Fukuda S, Takao S, Shigemoto N, Tanizawa Y, Seno M. Transition of genotypes associated with norovirus gastroenteritis outbreaks in a limited area of Japan, Hiroshima Prefecture, during eight epidemic seasons. **Arch Virol**, 2010;155:111-5.

Fumian TM, Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, Siqueira AM, Soares LS *et al.* Detection of a novel recombinant strain from the Amazon region of Brazil in 2008. **Arch Virol**, 2012;157(12): 2389-92. doi: 10.1007/s00705-012-1428-2.

Gabbay YB, Leite JP, Oliveira DS, Nakamura LS, Nunes MR, Mascarenhas JD *et al.* Molecular epidemiology of astrovirus type 1 in Belém, Brazil, as an agent of infantile gastroenteritis, over a period of 18 years (1982-2000): identification of two possible new lineages. **Virus Res**, 2007;129(1):166-74.

Gallimore CI, Cubitt D, du Plessis N, Gray JJ. Asymptomatic and symptomatic excretion of Norovirus during a hospital outbreak of gastroenteritis. **J Clin Microbiol**, 2004;42(5):2271-4.

Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A *et al.* Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: Implication for vaccine development. **J Infect Dis**, 1996;174, Suppl. 1:30-6.

Ghosh S, Samajdar S, Sinha M, Kobayashi N, Taniguchi K, Naik TN. Molecular characterization of rare bovine group A rotavirus G15P[11] and G15P[21] strains from eastern India: identification of simian SA11-like VP6 genes in G15P[21] strains. **Virus Genes**, 2008;37(2):241-9.

Girard MP, Steele D, Chaignat CL, Kieny MP. A review of vaccine research and development: human enteric infections. **Vaccine**, 2006; 24:2732-50.

Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. **N Engl J Med**, 2009;361:1776-85.

Gomes SA, Candeias JAN, Monteiro SP, Pereira HG, Niel C. New Genome Types of Adenovirus Types 1,2 and 5 Isolated from Stools of Children in Brazil. **J Clin Microbiol**, 1989;27(5):1022-6.

Grahn A, Elmgren A, Aberg L, Svensson L, Jansson PA, *et al.* Determination of Lewis FUT3 gene mutations by PCR using sequence-specific primers enables efficient genotyping of clinical samples. **Hum Mutat**, 2001;18(4):358-9.

Guerrant RL, Kosek M, Moore S, Lorntz B, Brantley R, Lima AA. Magnitude and impact of diarrheal diseases. **Arch Med Res**, 2002;33:351-5.

Hall A, Lopman BA, Payne DC, Patel MM, Gastañaduy PA, Jan Vinjé J *et al.*, Norovirus Disease in the United States. **Emerg Infect Dis**, 2013;19(8).
www.cdc.gov/eid

Hall A, Vinjé J, Lopman B, Park GW, Yen C, Gregoricus N. Updated Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines **MMWR**, 2011;60(RR03):1-15.

Harrach B, Benko M. Phylogenetic analysis of adenovirus sequences. Proof of the necessity of establishing a third genus in the Adenoviridae family. In: Wold WSM, ed. Adenovirus Methods and Protocols. vol 21. Totowa: **Humana Press Inc.** 1998.309–39.

Harrington PR, Lindensmith L, Yount B, Moe CL, Baric RS. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. **J Virol**, 2002;76:12325-12343.

Hársi CM, Rolim DP, Gomes SA, Gili AE, Stewien KE. Adenovirus genome types isolated from stools of children with gastroenteritis in São Paulo, Brazil. **J Med Virol**, 1995; 26:1783-6.

Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrilamide gels. **J Clin Microbiol**, 1982;16(3):473-7.

Hierholzer, J. C. Adenoviruses in the immunocompromised host. **Clin Microbiol Rev**, 1992;5:262–74.

Huang P, Farkas T, Marionneau S, Zhong W, Ruvoen-Clouet N, *et al.* Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. **J Infect Dis**, 2003;188:19–31.

Huang P, Farkas T, Zhong W, Tan M, Thornton S, *et al.* Norovirus and histo-blood group antigenic demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. **J Virol**, 2005;79:6714-22.

Hutson AM, Airaud F, Le Pendu J, Estes MK, Atmar RL. Norwalk virus infection associates with secretor status genotyped from sera. **J Med Virol**, 2005;77:116–20.

Jeong HS, Jeong A, Cheon DS. Epidemiology of astrovirus in infection in children. **Korean J Pediatr**, 2012;55(3):77-82.

Jiang B, Monroe SS, Koonin EV, Stine SE, Glass RI. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1993;15(22):10539–43.

Jiang X, M Wang, DY Graham, MK Estes. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. **J Virol**, 1992;66:6527-32.

Jones MS, Harrach B, Ganac RD, Gozum MMA, dela Cruz WP, Riedel B *et al*. New adenovirus species found in patient presenting with gastroenteritis. **J Virol**, 2007; 81:5978–84.

Kapikian AZ *et al*. In Knipe DM *et al* eds. **Fields Virology**, ed. 4. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, CD-room, 2001.

Kelly RJ, Rouquyer S, Giorgi D, Lennon GG, Lowe JB. Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group alfa (1,2)-fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. **J Biol Chem**, 1995;270:4640-9.

King A, Lefkowitz E, Adams M, Carstens E. eds. *Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. San Diego: Academic Press. 2011.

Koch J, Wiese-Posselt M. Epidemiology of Rotavirus infections in children < 5 years of age. **Pediatr Infect Dis J**, 2011;30(1):1-6.

Koda Y, Tachida H, Liu Y, Soejima M, Ghaderi AA, *et al.* Contrasting patterns of polymorphisms at the ABO-secretor gene (FUT2) and plasma alpha(1,3)-fucosyltransferase gene (FUT6) in human populations. **Genetics**, 2001;158:747-56.

Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, *et al.* Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. **J Virol Meth**, 2002;100:107-14.

Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull WHO**, 2003;81: 197-204.

Kovács GM, Davison AJ, Zakhartchouk AN, Harrach B. Analysis of the first complete genome sequence of an Old World monkey adenovirus reveals a lineage distinct from the six human adenovirus species. **J Gen Virol**, 2004;85:2799–807.

Kubota T, Kumagai A, Ito H, Furukawa S, Someya Y, *et al.* Structural basis for the recognition of Lewis antigens by genogroup I norovirus. **J Virol**, 2012;86(20):11138-50.

Lau CS, Wong DA, Tong LK, Lo JY, Ma AM, *et al.* High rate and changing molecular epidemiology pattern of norovirus infections in sporadic cases and outbreaks of gastroenteritis in Hong Kong. **J Med Virol**, 2004;73:113-117.

Lee TW, Kurtz JB. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. **J Gen Virol**, 1981;57:421-4.

Leite JP, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization and sequence analysis. **Arch Virol**, 1996;141(6):2265-74.

Le Pendu J, Ruvoen-Clouet N, Kindberg E, Svensson L. Mendelian resistance to human norovirus infections. **Sem Immunol**, 2006;18:375–86.

Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H *et al.* Molecular epidemiology of Adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. **Microbiol Immunol**, 2005;49:121–8.

Li QG, Henningsson A, Juto P, Elgh F, Wadell G. Use of restriction fragment analysis and sequencing of a serotype-specific region to type adenovirus isolates. **J Clin Microbiol**, 1999;37(4):844-7.

Lindesmith LC, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, *et al.* Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. **Nat Med**, 2003;9:548-553.

Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, *et al.* Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. **PLoS Med**. 5:e31 2008. doi:10.1371/journal.pmed.0050031.

Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, Rudan I, Campbell H, Cibulskis R, Li M, Mathers C, Black RE; Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The Lancet**, 2012;379(9832):2151-61.

Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, *et al.* Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002–2003. **Emerg Infect Dis**, 2004;10:1827–34.

Lozer DM, Souza TB, Monfardini MV, Vicentini F, Kitagawa SS, Scaletsky ICA, *et al.*, Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities (dados não publicados).

Lyman WH, Walsh JF, Kotch JB, Weber DJ, Gunn E, Vinjé J. Prospective study of etiologic agents of acute gastroenteritis outbreaks in child care centers. **J Pediatrics**, 2009;154(2):253-7.

Madisch I, Harste G, Pommer H, Heim A Phylogenetic analysis of the main neutralization and hemagglutination determinants of all human adenovirus prototypes as a basis for molecular classification and taxonomy. **J Virol**, 2005;79:15265–76.

Magalhães GF, Nogueira PA, Grava AF, Penati M, Silva LHP, Orlandi PP *et al.* Rotavirus and adenovirus in Rondônia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2007;102(5):555-7.

Manun'ebo MN, Haggerty PA, Kalengaie M, Ashworth A, Kirkwood BR. Influence of demographic, socioeconomic and environmental variables on childhood diarrhoea in a rural area of Zaire. **J Trop Med Hyg**, 1994;97:31-8.

Marionneau S, A Cailleau-Thomas, J Rocher, B Le Moullac-Vaidye, N Ruvoën-Clouet, *et al.* ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. **Biochimie**, 2001;83:565-73.

Marionneau S, N Ruvöen-Clouet, B Le Moullac-Vaidye, M Clement, A Cailleau-Thomas, *et al.* Norwalk virus binds to histo-blood group antigens on gastro-duodenal epithelial cells of secretor individuals. **Gastroenterology**, 2002;122:1967-77.

Marshall JA, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Cox BJ, *et al.* Incidence and characteristics of endemic Norwalk-like virus-associated gastroenteritis. **J Med Virol**, 2003;69:568-78.

Martini IJ, Gennari GM, Martins SS, Gouvêa VS, Gatti MS. Changing distribution of human rotavirus serotypes during two epidemic outbreaks of gastroenteritis in Campinas, São Paulo, Brazil, 2003-2004: detection of G6 strains. **J Clin Virol**, 2008;43(2):244-6.

Matsushima Y, Shimizu H, Kano A, Nakajima E, Ishimaru Y, Dey SK *et al.* Novel Human Adenovirus Strain, Bangladesh. **Emerg Infec Dis**, 2012; 18(5):846-8.

Matsushima Y, Shimizu H, Kano A, Nakajima E, Ishimaru Y, Dey SK *et al.* Genome sequence of a novel virus of the species human adenovirus D associated with acute gastroenteritis. **Genome Announc**, 1(1):e00068-12. 2013. doi:10.1128/genomeA.00068-12.

Matthews JE, Dickey BW, Miller RD, Felzer JR, Dawson BP, Lee AS. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup **Epidemiol Infect** 2012;140:1161-72.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM *et al.* Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. **J Virol**, 2008a;82(7):3204-19.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK *et al.* Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Arch Virol**, 2008b;153(8):1621-9.

Matthijnssens J. GENOTYPE CONSTELLATION OF EPIDEMIOLOGICALLY IMPORTANT HUMAN ROTAVIRUSES 10th International Rotavirus Symposium, Bangkok, Thailand, September 19-21 2012.

Medici MC, Abelli LA, Martinelli M, Dettori G, Chezzi C. Molecular characterization of VP4, VP6 and VP7 genes of a rare G8P[14] rotavirus strain detected in an infant with gastroenteritis in Italy. **Virus Res**, 2008;137(1):163-7.

Melli LCFL, Waldman EA. Tendência temporal e desigualdades na mortalidade por diarreias em menores de 5 anos. **Arch Pediatr Urug**, 2011;82(1): 39-46.

Miagostovich MP, Ferreira FFM, Guimarães FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SLB, Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occurring Naturally in the Stream Waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. **Appl Environ Microbiol**, 2008;74(2):375–82.

Mistchenko AS, Robaldo JF, Rosman FC, Koch ER, Kajon AE. Fatal adenovirus infection associated with new genome type. **J Med Virol**, 1998;54(3):233-6.

Mølbak K, Fischer TK, Mikkelsen CS. The estimation of mortality due to rotavirus infections in sub-Saharan Africa. **Vaccine**, 2001;19(4-5):393-5.

Monica B, Ramani S, Banerjee I, Primrose B, Iturriza-Gomara M, *et al.* Human Caliciviruses in Symptomatic and Asymptomatic Infections in Children in Vellore, South India. **J Med Virol**, 2007;79(5):544-51.

Moy RJ, Booth IW, Choto RG, McNeish AS. Recurrent and persistent diarrhoea in a rural Zimbabwean community: a prospective study. **J Trop Pediat**, 1991;37:293-9.

Natchu UCM e Bhatnagar S. Diarrhoea in children: identifying the cause and burden. **The Lancet**, 2013;382(9888):184-6.

Nilsson J, Rydell GE, Le Pendu J, Larson G. Norwalk virus-like particles bind specifically to A, H blood and difucosylated Lewisbut not to B histo-blood group active glycosphingolipids. **Glycoconj J**, 2009;26(9):1171-80.

Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, *et al.* Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. **J Med Virol**, 1997;53: 372-83.

Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. **J Clin Microbiol**, 1995;33(4):797-801.

Nordgren J, Kindberg E, Lindgren P, Matussek A, Svensson L. Norovirus gastroenteritis outbreak with a secretor-independent susceptibility pattern, Sweden. **Emerg Inf Dis**, 2010;16 81-7.

Nordgren J, Nitiema LW, Ouermi D, Simpore J, Svensson L. Host Genetic Factors Affect Susceptibility to Norovirus Infections in Burkina Faso. **PLoS ONE**, 8(7): e69557. 2013. doi:10.1371/journal.pone.0069557

Oliveira F. Saúde da População Negra. Brasília: OPAS 2003.

Orlandi PP, Silva T, Magalhães GF, Alves F, de Almeida Cunha RP, Durlacher R *et al.* Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2001;96(5):621-5.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg Infect Dis**, 2003;9(5):565-72.

Parrino TA, Scriber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. **N Engl J Med**, 1977;297:86-9.

Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. **Emerg Infect Dis**, 2008;14(8):1224-31.

Patnaik SK, Helmberg W, Blumenfeld OO. BGMUT: NCBI dbRBC database of allelic variations of genes encoding antigens of blood group systems **Nucl Acids Res**, 2011;13: 1-7.

Paton JT. Rotavirus Diversity and Evolution in the Post-Vaccine World. **Discovery Medicine**, 2012;13(68):85-97.

Paul SK, Kobayashi N, Nagashima S, Ishino M, Watanabe S, Alam MM *et al.* Phylogenetic analysis of rotaviruses with genotypes G1, G2, G9 and G12 in Bangladesh: evidence for a close relationship between rotaviruses from children and adults. **Arch Virol**, 2008;153(11):1999-2012.

Pereira-Filho E, Faria NRC, Fialho AM, Assis RS, Almeida MMS, Rocha M *et al.* Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. **J Med Microbiol**, 2007; 56:313-9.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Barth OM, Suttmoller F, de Farias V *et al.* Comparison of PAGE, immuno-electron microscopy and enzyme immunoassay for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 1983;78(4):483-90.

Pietruchinski E, Benati F, Lauretti F, Kisielius J, Ueda M, Volotão EM *et al.* Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. **J Med Virol**, 2006;78(9):1241-9.

Pont SJ, Grijalva CG, Griffin MR, Scott TA, Cooper WO. National rates of diarrhea-associated ambulatory visits in children. **J Pediatr**, 2009;155(1):56-61.

Prasad BVV, Matson DO, Smith AW. Three dimensional structure of calicivirus. **J Mol Biol**, 1994;240:256-64.

Pring-Akerblom P, Trijssenaar FE, Adrian T, Hoyer H. Multiplex polymerase chain reaction for subgenus-specific detection of human adenoviruses in clinical samples. **J Med Virol**, 1999;58(1):87-92.

Procter J, Crawford J, Bunce M, Welsh KI. A rapid molecular method (polymerase chain reaction with sequence-specific primers) to genotype for ABO blood group and secretor status and its potential for organ transplants. **Tis Antig**, 1997;50:475-83.

Reither K, Ignatius R, Weitzel T, Seidu-Korkor A, Anyidoho L, Saad E *et al.* Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics **BMC Infect Dis**, 7:104 2007. doi:10.1186/1471-2334-7-104.

Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, Miagostovich MP *et al.* Hospitalization due to noroviruses and genotypes of rotavirus in pediatrics patients state of Espírito Santo. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2008;103(2):201-6.

Richmond SJ, Caul EO, Dunn SM, Ashley CR, Clarke SKR, Seymour NR. An outbreak of gastroenteritis in young children caused by adenoviruses. **The Lancet** 1979;i:1178-80.

Robinson CM, Shariati F, Gillaspay AF, Dyer DW, Chodosh J. Genomic and bioinformatics analysis of human adenovirus type 37: new insights into corneal tropism. **BMC Genomics**, 2008;9:213.

Robinson CM, Shariati F, Zaitshik J, Gillaspay AF, Dyer DW, Chodosh J. Human adenovirus type 19: Genomic and bioinformatics analysis of a keratoconjunctivitis isolate. **Virus Res**, 2009;139:122–9.

Rougemont A, N Ruvoën-Clouet, B Simon, M Estienney, C Elie-Caille, *et al.* (2011) Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. **J Virol**, 85:4057-70.

Rougemont A, Kaplon J, Pillet S, Mory O, Gagneur A, Minoui-Tran A *et al.* Molecular and clinical characterization of Rotavirus from diarrheal infants admitted of pediatric emergency units in France. **Pediatr Infect Dis J**, 2011;30(2):118-24.

Roy S, Calcedo R, Medina-Jaszek A, Keough M, Peng H, Wilson JM. Adenoviruses in Lymphocytes of the Human Gastro-Intestinal Tract. **PLoS ONE** 6(9): e24859. 2011. doi:10.1371/journal.pone.0024859.

Royuela E. Molecular cloning, expression and first antigenic characterization of human astrovirus VP26 structural protein and a C-terminal deleted form. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, 2010;33(1):1-14.

Russel WC. Adenoviruses: update on structure and function. **J Gen Virol**, 2009;90:1-20.

Rux JJ, Burnett RM. Adenovirus structure. Review. **Hum Gene Ther**, 2004;15(12):1167-76.

Rydell GE, Nilsson J, Rodriguez-Diaz J, Ruvoën-Clouet N, Svensson L, *et al.* Human noroviruses recognize sialyl Lewis x neoglycoprotein. **Glycobiology**, 2009;19:309-20.

Seto D, Chodosh J, Brister JR, Jones MS. Letters to the Editor Using the Whole-Genome Sequence To Characterize and Name Human Adenoviruses **J Virol**, 2011;85(11):5701–2.

Siebenga JJ, H Vennema, DP Zheng, J Vinjé, B E Lee *et al.* Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. **J Infect Dis**, 2009;200:802-12.

Silva AM, Leite EG, Assis RM, Majerowicz S, Leite JP. An outbreak of gastroenteritis associated with Astrovirus serotype 1 in a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2001;96(8):1069-73.

Silva PA, Santos RA, Costa PS, Teixeira JM, Giugliano LG, Andreasi MS *et al.* The circulation of human astrovirus genotypes in the central West Region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2009;104(4):655-8.

Siqueira JAM, Linhares AC, Gonçalves MS, Carvalho TCN, Justino MCA, Mascarenhas JDP *et al.* Group A rotavirus and norovirus display sharply distinct seasonal profiles in Belém, northern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2013;108(5):661-4.

Soares CC, Volotão EM, Albuquerque MC, Da Silva FM, De Carvalho TR, Nozawa CM *et al.* Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. **J Clin Virol**, 2002; 23:171-7.

Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MC, Maranhão AG, Rocha LN *et al.* Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. **Emerg Infect Dis**, 2007;13(8):1244-6.

Souza EC, Martinez MB, Taddei CR, Mukai L, Gilio AE, Racz ML *et al.* Etiologia das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **Pediatrics**, 2002;78(1):31-8.

Spano LC, Sadovsky AD, Segui PN, Saick KW, Kitagawa SM, Pereira FE *et al.* Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. **J Med Microbiol**, 2008;57(3):359-63.

Sprengel J, Schmitz B, Heuss-Neitzel D, Zock C, Doerfler W. Nucleotide sequence of human adenovirus type 12 DNA: comparative functional analysis. **J Virol**, 1994;68(1):379-89.

Straub TM, Höner zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA *et al.* In vitro cell culture infectivity assay for human norovirus. **Emerg. Infect Dis**, 2007;13(3):396–403.

Tan M, M Jin, H Xie, Z Duan, X Jiang, Z Fang. () Outbreak studies of a GII-3 and a GII.4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection. **J Med Virol**, 2008;80:1296-301.

Taube S, Jiang M and Wobus CE. Glycosphingolipids as Receptors for Non-Enveloped Viruses. **Viruses**, 2010;2:1011-49. doi:10.3390/v2041011

Thorven M, A Grahn, KO Hedlund, H Johansson, C Wahlfrid, *et al.* A homozygous nonsense mutation (428G>A) in the human FUT2 gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. **J Virol**, 2005;79:15351-5.

Trivedi TK, Desai R, Hall AJ, Patel M, Parashar UD, *et al.* Clinical characteristics of norovirus-associated deaths: A systematic literature review. **Am J Infect Control**, 2012. Dec 21. pii: S0196-6553(12)01155-8. doi: 10.1016/j.ajic.2012.08.002.

Turcios RM, Widdowson MA, Sulka AC, Mead PS, Glass RI. Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States, 1998-2000. **Clin Infect Dis**, 2006;42(7):964-9.

Uhnoo I, Wadell G, Svensson L, Johansson ME. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. **J Clin Microbiol**, 1984; 20:365-72.

Vega E, Vinjé J. Novel GII.12 Norovirus strains, United States, 2009-2010. **Emerg Infect Dis**, 2011;17(8):1516-8.

Vicentini F, Denadai W, Gomes YM, Rose TL, Ferreira MSR, Le Moullac-Vaidye B *et al.* Molecular characterization of norovirus and HBGA from infected Quilombola children in Espírito Santo state, Brazil. **PLoS ONE** 8(7):e69348. 2013. doi:10.1371/journal.pone.0069348.

Victoria M, Miagostovich MP, Ferreira MS, Vieira CB, Fioretti JM, *et al.* Bayesian coalescent inference reveals high evolutionary rates and expansion of Norovirus populations. **Infect Genet Evol**, 2009;9(5):927-32.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich M. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Pediatr Infect Dis J**, 2004;26(7):602-6.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich MP. Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **J Med Virol**, 2007;79(7):939-44.

Vinjé J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. **J Virol Methods**, 2004;116(2):109-17.

Walsh MP, Chintakuntlawar A, Robinson CM, Madisch I, Harrach B, Hudson NR *et al.* Evidence of Molecular Evolution Driven by Recombination Events Influencing Tropism in a Novel Human Adenovirus that Causes Epidemic Keratoconjunctivitis. **PLoS ONE**, 4(6):e5635. 2009. doi:10.1371/journal.pone.0005635.

Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, *et al.* Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus—United States, 2002. **J Infect Dis**, 2004; 190:27–36.

Willcocks MM, Brown TDK, Madeley CR, Carter MJ. The complete sequence of a human astrovirus. **J Gen Virol**, 1994;75:1785-8.

Yen C, Steiner CA, Barrett M, Curns AT, Hunter K, Wilson E *et al.* Racial disparities in diarrhea-associated hospitalizations among children in five US states, before and after introduction of rotavirus vaccine. **Vaccine**, 2010;28(46):7423-6.

Yolken RH, Lawrence F, Leister F, Takiff HK, Strauss SE. Gastroenteritis associated with enteric type adenovirus in hospitalised infants. **J Pediatr**, 1982;101:21-6.

Zakikhany K, Allen DJ, Brown D, Iturriza-Gómara M. Molecular Evolution of GII-4 norovirus strains. **PLoS ONE**, 7(7):e41625. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0041625.

Zeller M, Rahman M, Heylen E, De Coster S, De Vos S, Arijs I *et al.* Rotavirus incidence and genotype distribution before and after national rotavirus vaccine introduction in Belgium. **Vaccine**, 2010;28(47):7507-13.

Zhang X-F, Tan M, Chhabra M, Dai Y-C, Meller J, Jiang X. Inhibition of Histo-blood Group Antigen Binding as a Novel Strategy to Block Norovirus Infections. **PLoS ONE**, 8(7): e69379. 2013. doi:10.1371/journal.pone.0069379

10 ANEXOS

10.1 ANEXO I - CARACTERIZAÇÃO DO TERRITÓRIO QUILOMBOLA

O território Sapê do Norte e suas múltiplas comunidades está localizado no norte do estado do Espírito Santo, numa área de transição entre as regiões sudeste e nordeste do Brasil, considerada ainda como porta para a região do semiárido brasileiro, caracteriza-se por terras baixas, quentes e em processo de desertificação. A região estudada está situada geograficamente apresentadas as condições de vida nas comunidades Quilombolas. Comunidades que apesar de heterogêneas em vários aspectos, encontram-se oprimidas principalmente pelo cultivo de eucalipto e exploração de petróleo e gás.

As comunidades mais tradicionais, ainda sobrevivem do plantio do aipim (mandioca), para a produção de farinha e da tapioca, que são comercializados principalmente no mercado municipal de São Mateus, feiras livres e festas populares. Outras já cultivam a terra com diversidade de produção agrícola e com alguma tecnologia, conseguem manter pequenas produções de café, pimenta do reino, maracujá entre outros.

A quase totalidade das comunidades rurais não possui água tratada, rede de esgoto ou coleta de lixo. A distância média para uma Unidade Básica de Saúde é de aproximadamente 10km. Apesar de estarem inseridas nos programas do SUS, PACS e em alguns casos, do ESF, a visita da Agente Comunitária de Saúde (ACS) é extremamente dificultada pelas distâncias e condições das estradas.

Muitas famílias são contempladas com alguns programas do Governo Federal, como o "Brasil, um milhão de cisternas", "Luz para todos", "Bolsa Família" e mais recentemente dentro do Territórios da Cidadania, algumas casas receberam módulos com banheiros e cubas para lavar roupa. Ainda assim a cultura de não utilização de privadas e a consequente defecação na mata é preservada entre muitos.

Entre os mais pobres, nas casas de sapê, ainda não há condições adequadas de armazenamento de alimentos, como geladeira e armários fechados, como pode ser visualizado nas fotos a seguir.

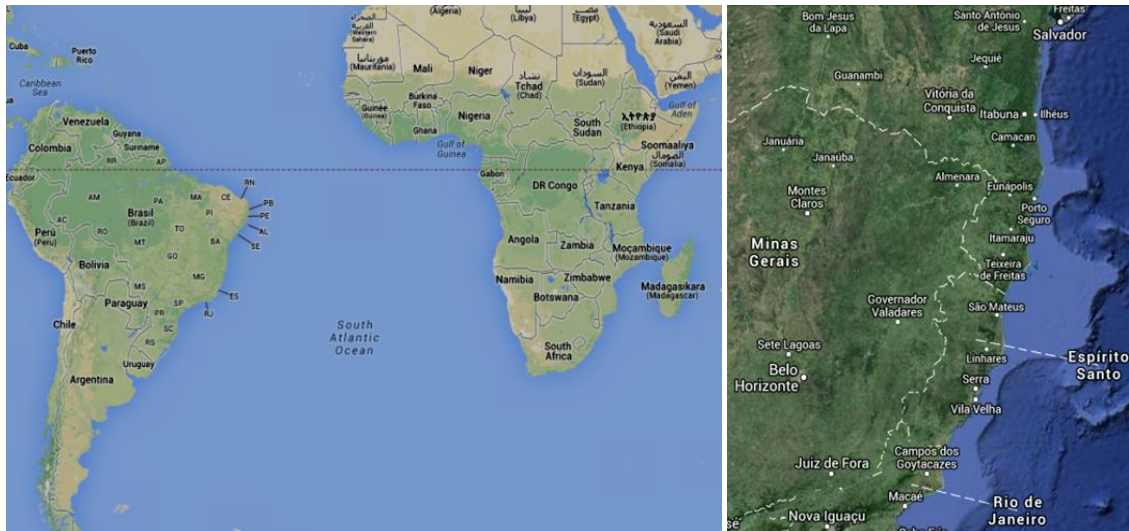


Figura 14. Localização geográfica das comunidades Quilombolas. O Brasil e a proximidade com os países de origem dos negros escravos africanos ao sul da Linha do Equador, como Angola, Congo e Moçambique na região central do continente Africano (E). O estado do Espírito Santo, com o município de São Mateus ao norte (D). Fonte. Google e Dados cartográficos@2013.



Figura 15. Comunidades próximas à zona urbana. O campus da Ufes em São Mateus inserido em área produtora de eucalipto, localizada em território quilombola e vizinha às comunidades do Litorâneo e Jambreiro (E). A floresta com monocultura de eucalipto (D). Fonte: Google e Image @2013 Digital Globe.



Figura 16. Atividades produtivas. A comunidade de São Domingos, organização das casas e nenhum aproveitamento da terra (E). A comunidade de Angelim II, em parceria com a iniciativa privada, mantém uma estufa para clonagem de eucalipto gerando emprego e renda (D). Fonte: Google e Image @2013 Digital Globe.



Figura 17. Proximidade com campos de petróleo e gás natural. A comunidade de Linharinho inserida na "floresta" dos eucaliptos (E). Proximidades da comunidade, mostrando campos de petróleo e gás, inseridos na "floresta" dos eucaliptos. Fonte: Google e Image @2013 Digital Globe.




Figura 18. Fontes de água à população. As diferentes fontes e oferta de água impõe condições diferenciadas para o aproveitamento da terra, mesmo entre as comunidades. . Fonte: Google e Image @2013 Digital Globe.



Figura 19. Condições de moradia. Moradias nas comunidades de Córrego do Sapato e São Domingos, mostrando a falta de estrutura para armazenamento e preparo dos alimentos. Fonte: Google e Image @2013 Digital Globe.

10.2 ANEXO II - TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA A COLETA DE FEZES E SANGUE



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

Cib
Ribe


TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO


A Coordenação dos projetos de pesquisa: **"Enteropatógenos bacterianos em diarreia aguda de crianças quilombolas e da periferia urbana de São Mateus, ES."**, **"Gastrenterite aguda em crianças de comunidades Quilombolas e Urbana no município de São Mateus: prevalência e análise molecular de rotavírus e parasitas intestinais."** e **"Enteropatógenos Virais e Bacterianos em Crianças Quilombolas do Norte do Espírito Santo"**, vem solicitar seu livre consentimento para a coleta de amostras fecais diarréicas de crianças menores de cinco anos sob sua responsabilidade, assim como de seus dados sócio-econômicos. Esclarecemos ainda que:

- As amostras de fezes serão coletadas pelo responsável pela criança, com a orientação do Agente Comunitário de Saúde;
- Não há qualquer pagamento em dinheiro decorrente da sua participação nesta pesquisa ou das análises laboratoriais das fezes;
- Será garantido sigilo quanto aos dados pessoais, assegurando-lhe absoluta privacidade;
- Os resultados deste estudo ajudarão na organização dos serviços de saúde voltados para a realidade dos entrevistados e utilizados para fins de publicação científica;
- O declarante tem o direito de se recusar a responder as perguntas que lhe ocasionem constrangimentos, de interromper a entrevista a qualquer tempo, assim como de retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalidade alguma.

Eu, Edna Marques Santos, DI. 096724237-89 CPF
representante legal da criança Anna Paula Sampaio Parachemeu (minha)
(grau de parentesco): filha e que fui esclarecido sobre os objetivos destas pesquisas DECLARO ter entendido o que me foi explicado e aceitar voluntariamente participar.

São Mateus, 22 de agosto de 200 8


Assinatura do Declarante


Assinatura do entrevistador

Coordenadores: Allan Kardec de Lima, Fernando Vicentini e Wilson Denadai, docentes da Universidade Federal do Espírito, no CEUNES. **Contato: 27 3763 8691 ou 3763 8696.**

Centro Universitário Norte do Espírito Santo
 Rua Humberto de Almeida Franklin, 257 - Bairro Universitário, CEP 29.933-415 (Sede Provisória) - Tel.: +55 (27) 3763-8650
 Avenida João XXIII, 1.544 - Bairro: Boa Vista, CEP 29.931-220 (Pólo Universitário) - Tel.: +55 (27) 3763-8500
 São Mateus - ES
CNPJ nº 16.118.000/0001-00

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: "Norovirus em crianças quilombolas com e sem gastroenterite e fenótipo ABH-Lewis e status secretor como indicador da susceptibilidade à infecção"

Estamos estudando na sua comunidade as causas de diarreia nas crianças (cocô mole e em número maior de vezes do que o normal). Muitas bactérias, vírus e protozoários (microorganismos – organismos muito pequenos que não conseguimos enxergar naturalmente) podem causar essa doença que pode até fazer com que seu filho(a) não se sinta bem por uns dias e até pode ir para o hospital por causa disso. Um desses microorganismos que estamos procurando (norovirus) tem muitos tipos diferentes e algumas pessoas tem ele sem ter a doença. Pode acontecer que seu(ua) filho(a) tenha este vírus mas não tenha a diarreia e o exame de sangue pode ajudar a ver isso. Por isso, pedimos seu consentimento para coletar um pouco de sangue (5 mililitros, mais ou menos uma colher de sopa) dele(a) para saber o tipo de sangue (ABH-Lewis) e se é ou não naturalmente resistente à doença pelo tipo de vírus detectado. A coleta de sangue pode causar uma pequena dor no hora de colocar agulha. Essa informação ajuda a conhecer se vocês apresentam essa resistência ou não.

O nome de seu(ua) filho(a) ou de qualquer pessoa de sua família não será divulgado, ou seja, a identidade de vocês será preservada. Você pode se recusar a participar esta pesquisa sem que você ou sua família sejam afetados.

Eu, Elenilza dos Santos (pai/mãe) ou responsável por Kaillany Santos do Nascimento, autorizo a coleta de sangue meu filho(a) Kaillany Santos do Nascimento para estudo de tipo de sangue (fenótipo ABH-Lewis), mesmo que ele (a) não esteja com a doença. Declaro que recebi todas as explicações necessárias e que compreendi todas elas. Sei também que caso eu tenha alguma dúvida sobre o estudo posso entrar em contato com o(a) Agente Comunitário(a) de Saúde ou com os pesquisadores para pedir mais esclarecimentos. Declaro ainda que posso desistir de participar do estudo e pedir para que se desfaçam do sangue coletado, sem que isso traga qualquer prejuízo a mim ou a qualquer membro da minha família. Mesmo que isso aconteça, posso ainda me beneficiar das orientações para a saúde que serão dirigidas a minha comunidade.

Nome do Responsável: Elenilza dos Santos

Data e Local: 27/09/2011, Comunidade: São Cristóvão

Pesquisadores:

Prof. Fernando Vicentini (CEUNES – São Mateus)
Tel p/ contato: (27) 3763.8691

Profa. Líliliana Cruz Spano (UFES – Vitória) Laboratório de Gastroenterite Infecciosa Dept. Patologia,
Centro de Ciências da Saúde – UFES. Tel p/ contato: (27) 3335.7297 / 9225.4481

Amostra 594

R: Tipo O⁺
Le^ab^m - não secretor