

Caracterização molecular de norovírus, sapovírus e astrovírus em crianças com gastroenterite aguda em Belém, Pará, Brasil

Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil

Caracterización molecular de norovirus, sapovirus y astrovirus en niños con gastroenteritis aguda en Belém (Pará, Brasil)

Glicélia Cruz Aragão

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

Consuelo Silva de Oliveira

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

Darleise de Souza Oliveira

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

Alexandre da Costa Linhares

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

Mirleide Cordeiro dos Santos

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

Yvone Benchimol Gabbay

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

Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

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

RESUMO

A importância dos norovírus (NoVs), sapovírus (SaVs) e astrovírus humanos (HAstVs) como causa de surtos de gastroenterites já está bem definida. Entretanto, poucos estudos têm descrito casos esporádicos de gastroenterite aguda causados por esses agentes. O objetivo deste estudo foi determinar o papel destes vírus na etiologia das gastroenterites agudas em crianças atendidas durante uma vigilância intensiva realizada em hospitais e ambulatórios de Belém, Brasil, de março a setembro de 2003. Um total de 305 espécimes fecais de pacientes com gastroenterite grave foram coletados e testados por reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), utilizando iniciadores específicos Mon 269 e Mon 270 para os HAstVs; p289 e p290 para os calicivírus humanos (HuCVs); e Mon 431/433 e Mon 432/434 para os NoVs. Sequenciamento dos amplicons de HAstV, HuCVs e NoVs, obtidos por RT-PCR, foi realizado usando os mesmos iniciadores. Das 305 amostras testadas, 96 (31,5%) apresentaram resultados positivos, sendo que 51 diagnosticadas como HuCVs, 40 como HAstVs e cinco infecções mistas. Das 56 (18,4%) amostras de HuCVs sequenciadas, 30 foram NoVs (9,8%) pertencentes aos genogrupos GI-4 e GII-4, e 15 (4,9%) SaVs dos grupos GI-1, GI-2 e GII-1. HAstVs foram detectados em 45 (14,7%) das amostras, incluindo os genótipos 1, 8 e 2. Esta pesquisa ressalta a importância destas viroses como causa de gastroenterite aguda e demonstra a circulação de diferentes genótipos durante o período de estudo. Estes resultados reforçam a necessidade de se estabelecer uma vigilância intensiva das gastroenterites causadas por estes vírus, de forma a poder avaliar o impacto da doença e monitorar os genótipos circulantes.

Palavras-chave: Norovírus; Sapovírus; Astrovírus Humano; Gastroenterite; Dados de Sequência Molecular.

INTRODUÇÃO

A gastroenterite aguda é uma das principais causas de morbimortalidade na infância, especialmente em países em desenvolvimento. Estima-se que mais de um bilhão de casos de diarreia aguda envolvendo crianças e adultos ocorra anualmente no mundo, fato este responsável por uma taxa de mortalidade de cerca de seis milhões entre crianças

menores de cinco anos de idade³². Além de bactérias e parasitas, muitos vírus estão associados a esses episódios de gastroenterite. Dentre eles, destacam-se os rotavírus do grupo A, como principal patógeno. No entanto, a importância dos norovírus (NoVs), sapovírus (SaVs), astrovírus humanos (HAstV) e adenovírus entéricos tem aumentado devido à utilização de novas metodologias⁴⁷.

NoVs e SaVs pertencem à família *Caliciviridae*, e acometem principalmente humanos. São vírus pequenos, não envelopados, com simetria icosaédrica, de RNA de fita simples e polaridade positiva². Análises filogenéticas classificaram os NoVs em cinco genogrupos distintos (GI-GV). Os genogrupos GI, GII e GIV são encontrados em

Correspondence / Correspondência / Correspondencia:

Yvone Benchimol Gabbay
Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia
Rodovia BR316, km 7, s/nº, Levilândia
CEP: 67.030-000 Ananindeua, Pará, Brasi
E-mail: yvonegabbay@iec.pa.gov.br

humanos, sendo que o GII tem sido descrito como o mais prevalente mundialmente⁴⁴. Os SaVs são divididos em sete genogrupos (GI-GVII), dentre os quais GI, GII, GIV e GV são conhecidos por infectar o homem³⁴.

Os NoVs são mundialmente considerados como principal causa de surtos de gastroenterite, sendo responsáveis por cerca de 80-90% dos casos, e sua transmissão ocorre principalmente por água e alimentos contaminados. Estudos recentes também descrevem estes vírus como um dos principais responsáveis por casos esporádicos de gastroenterite aguda detectados em hospitais e em comunidades. Os SaVs também têm sido associados tanto a surtos como a casos esporádicos de gastroenterite aguda³³.

Os HAsVs pertencem ao gênero Mamastrovirus (família Astroviridae). Estão associados a surtos, sendo reconhecidos como uma causa comum de gastroenterite não só em crianças, como também em idosos e indivíduos imunocomprometidos²⁷. São vírus pequenos, esféricos (28-30 nm de diâmetro), não envelopados, com polaridade positiva e genoma de RNA poliadenilado de fita simples (ssRNA), de aproximadamente 7kb de comprimento¹³. Até o momento, já foram descritos oito genótipos de HAsVs (HAsV-1-HAsV-8), sendo HAsV-1 o mais prevalente tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento^{6,46}.

A importância dos NoVs, SaVs e HAsVs como causa de surtos de gastroenterite aguda já está bem definida, entretanto poucas pesquisas têm descrito o envolvimento destes vírus em casos esporádicos, especialmente em países em desenvolvimento. Por esta razão, este estudo visa determinar o papel destes agentes na etiologia das gastroenterites agudas. Para isto, foram analisadas amostras fecais de crianças atendidas durante uma vigilância intensiva realizada em hospitais e ambulatórios de Belém de março a setembro de 2003. Os principais objetivos desta vigilância foram criar uma rede envolvendo as unidades de saúde locais e treinar a equipe tanto dos hospitais como do Instituto Evandro Chagas (IEC), visando pesquisas futuras com vacina contra rotavírus do grupo A (RV-A). Este estudo teve como enfoque principal a prevalência desses agentes, bem como sua caracterização molecular, a fim de determinar os genótipos circulantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

PACIENTES E ESPÉCIMES

Os espécimes fecais foram coletados de episódios graves de diarreia aguda durante vigilância para RV-A realizada em Belém, Estado do Pará, região norte do Brasil, de março a setembro de 2003. No momento do atendimento, um termo de consentimento foi obtido dos pais ou dos responsáveis legais das crianças participantes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do IEC. Um levantamento inicial foi conduzido em todos os hospitais pediátricos, ambulatórios e unidades de saúde localizadas em Belém, que forneciam assistência a crianças menores de três anos de idade, principalmente àquelas provenientes de famílias de baixa-renda que viviam sob condições sanitárias precárias e em elevados índices de aglomerados humanos. Foram feitos contatos prévios em todos esses locais e a vigilância das gastroenterites foi realizada por

meio de visitas diárias, a fim de detectar qualquer episódio de diarreia, definido por três ou mais evacuações líquidas ou semilíquidas em um período de 24 h, com duração inferior a 14 dias. Um total de 762 amostras fecais foi obtido durante os seis meses de pesquisa. As amostras foram inicialmente testadas quanto à presença dos RV-A e adenovírus entéricos, utilizando "kits" comerciais de ensaio imunoenzimático (EIE). No presente estudo, todos os espécimes negativos para ambos os vírus (305) foram testados para os HAsVs e HuCVs pela reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa (RT-PCR).

OBTENÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO RNA VIRAL

O ssRNA viral foi extraído de 300 µL de uma suspensão fecal a 10% utilizando sílica/tiocianato de guanidina, conforme descrito por Boom et al³, incluindo modificações introduzidas por Cardoso et al⁶. Na reação de transcriptase reversa foi usado um iniciador randômico [hexamer pd (N) 6-50 A260 units; Amersham Biosciences] para obtenção do cDNA. Foi realizada a reação de PCR usando os pares de iniciadores Mon 269/270 (região ORF2) para os HAsVs³⁰ e p289/290 (região da RNA polimerase) para os HuCVs²³. Os produtos obtidos por RT-PCR foram aplicados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e fotografados em aparelho Gel Doc 1000 (BioRad). As amostras que apresentaram fragmentos específicos de 449 pb, 319 pb e 331 pb, foram consideradas positivas para HAsVs, NoVs e SaVs, respectivamente. Amostras positivas para HAsVs e HuCVs e água Milli-Q estéril foram incluídas em todas as reações como controles positivos e negativo, respectivamente. Algumas amostras que apresentaram baixa concentração de produto (bandas fracas) com os iniciadores para HuCVs também foram testadas com os iniciadores Mon 432/434 e Mon 431/433 (região da RNA polimerase), específicos para os NoVs dos genogrupos GI e GII, respectivamente¹¹.

SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS DE HASTVS, HUCVS E NOVS OBTIDOS POR RT-PCR

Os produtos foram purificados com o "kit" de extração de gel QiaQuick® (QIAGEN), conforme orientação do fabricante, e quantificados em gel de agarose a 1% com o marcador de peso molecular "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen). As sequências de nucleotídeos foram determinadas por ciclo direto usando o "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Applied Biosystems) com os iniciadores Mon 269 e Mon 270 para HAsVs, p289 e p209 para HuCVs e Mon 431/433 e Mon 432/434 para NoVs. Os fragmentos amplificados foram purificados por precipitação com isopropanol (60 e 70%). Os produtos foram analisados no sequenciador automático "3130X/Genetic Analyzer" (AB Applied Biosystems/Hitachi).

ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os dados das sequências de ambas as fitas foram alinhados e editados usando o programa "BioEdit Sequence Alignment Editor" (v. 7.0.5.3) e comparados com outras sequências padrão disponíveis no Banco de dados (GenBank). Os dendrogramas foram construídos utilizando o método de Neighbor-Joining (NJ) e software MEGA, versão 4.0⁴². A análise do "Bootstrap" foi realizada com 2 mil réplicas¹⁴.

NÚMERO DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS

As sequências de nucleotídeos determinadas neste estudo foram depositadas no banco de dados "GenBank" com os seguintes números de acesso: GU012316 a GU012345 para NoVs, GQ984294 a GQ984308 para SaVs e GQ920650 a GQ920672 para HAsVs.

RESULTADOS

De um total de 305 amostras testadas por RT-PCR, 96 (31,5%) apresentaram resultados positivos, sendo 51 classificadas como HuCVs, 40 como HAsVs e cinco infecções mistas. Dos 56 (18,4%) espécimes positivos para HuCVs, 45 foram sequenciados: 30 (66,7%) classificados como NoVs, genogrupos GI-4 (1; 3,3%) e GII-4 (29;

96,7%), e 15 (33,3%) como SaVs, genogrupos GI-1 (3; 20%), GI-2 (2; 13,3%) e GII-1 (10; 66,7%) (Figura 1, Tabela 1). As 11 amostras que apresentaram um fragmento amplificado com baixa concentração (banda fraca) na PCR foram testadas novamente usando iniciadores específicos para NoVs; em oito foram observados fragmentos específicos e três foram negativas. Após sequenciamento, apenas uma amostra resultou positiva para o genogrupo GII-4, e nas outras sete, como alguns nucleotídeos não puderam ser definidos, suas cepas não foram incluídas no dendrograma. Das 45 (14,7%) amostras classificadas como HAsVs, 37 (82,2%) pertenciam ao genótipo 1, quatro (8,9%) ao genótipo 8, duas (4,4%) ao genótipo 2 e duas (4,4%) não foram sequenciadas (Figura 2, Tabela 1). Observaram-se cinco infecções mistas: quatro envolvendo NoV/GII-4 e HAsV-1 e uma SaV/GII-1 e HAsV-8.

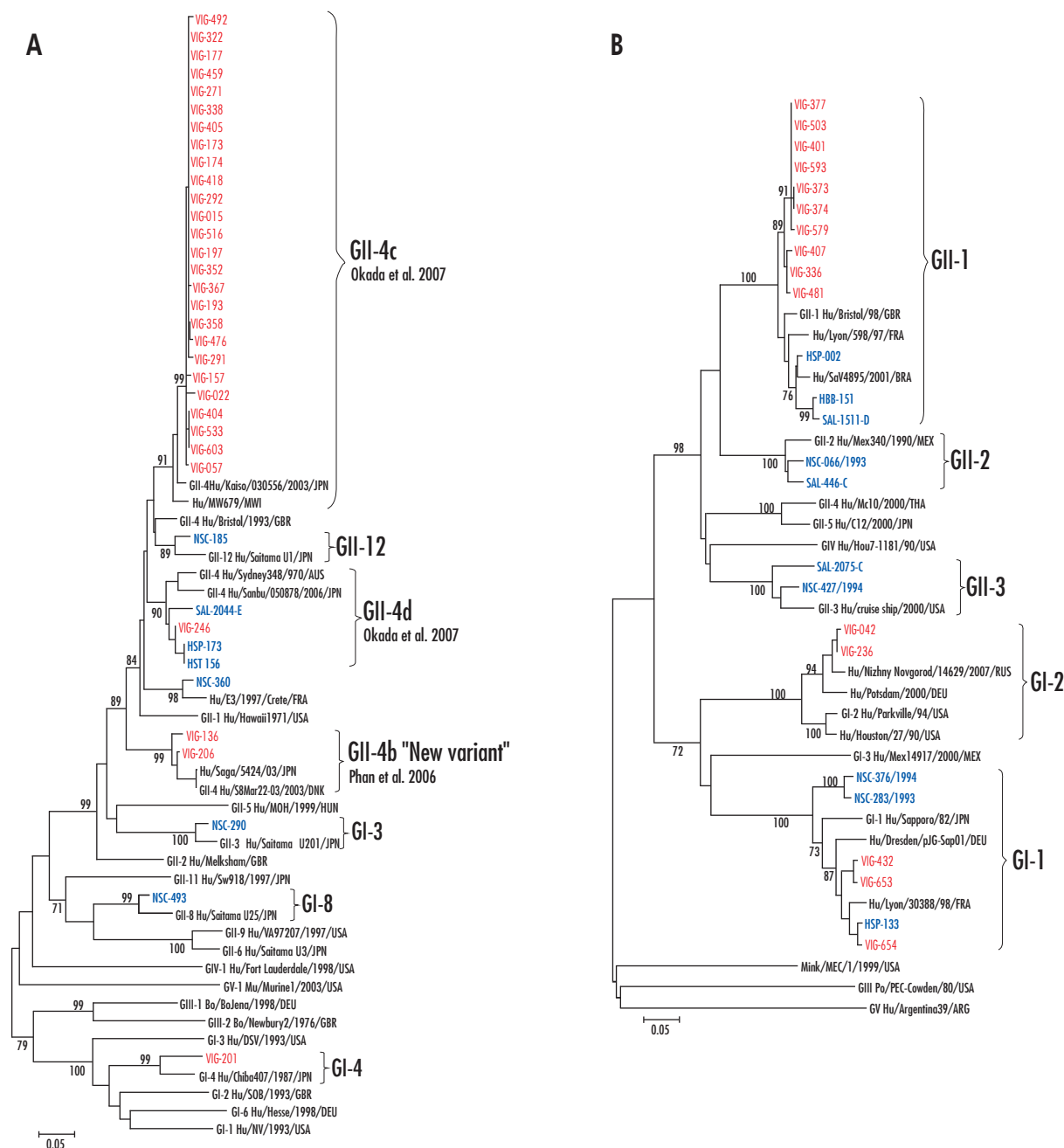


Figura 1 – Dendrogramas da região parcial da sequência da polimerase de RNA de norovírus (A) e sapovírus (B) amplificados de 45 pacientes de Belém, Estado do Pará, Brasil, de março a setembro de 2003. As cepas prototípicas são apresentadas no dendrograma juntamente com as cepas de outras localidades. O número acima de cada ramo corresponde ao valor de *bootstrap*. A barra é proporcional à distância genética. As amostras coletadas em 2003 em Belém (VIG) estão em vermelho; as amostras coletadas anteriormente na mesma cidade estão em azul

Tabela 1 – Distribuição de genótipos de norovírus, sapovírus e astrovírus, baseada na análise sequencial em espécimes fecais de 305 crianças diarreicas de Belém, Brasil, de março a setembro de 2003

Pos HuCVs Primers 289/290 N = 56 (18.4%) Sequenciados – 45		Pos HuCVs Primers 431-433 N = 11 (3.6%)		Pos HAsVs N = 45 (14.7%)			Infecções mistas N = 5 (1,6%)	
NoVs ^o	SaVs	NoVs*	Negativos	HAsV-1a	HAsV-2	HAsV-8	NT [†]	
30 (9,8%) GII-4 (96,7%) GI-4 (3,3%)	15 (4,9%) GII-1 (66,7%) GI-2 (13,3%) GI-1 (20%)	8 (2,6%) GII-4 (12,5%) NT [†] (87,5%)	3	37 (12,1%)	2 (0,7%)	4 (1,3%)	2 (0,7%)	HAsV-1/Nov-GII-4 – (80%) HAsV-8/SaV-GII-1 – (20%)

* Total de amostras positivas de NoV: 30 + 8 = 38 (12,5%);

† NT- Não tipados;

HuCVs: Calicivírus humanos; NoVs: Norovírus; SaVs: Sapovírus; HAsVs: Astrovírus humanos.

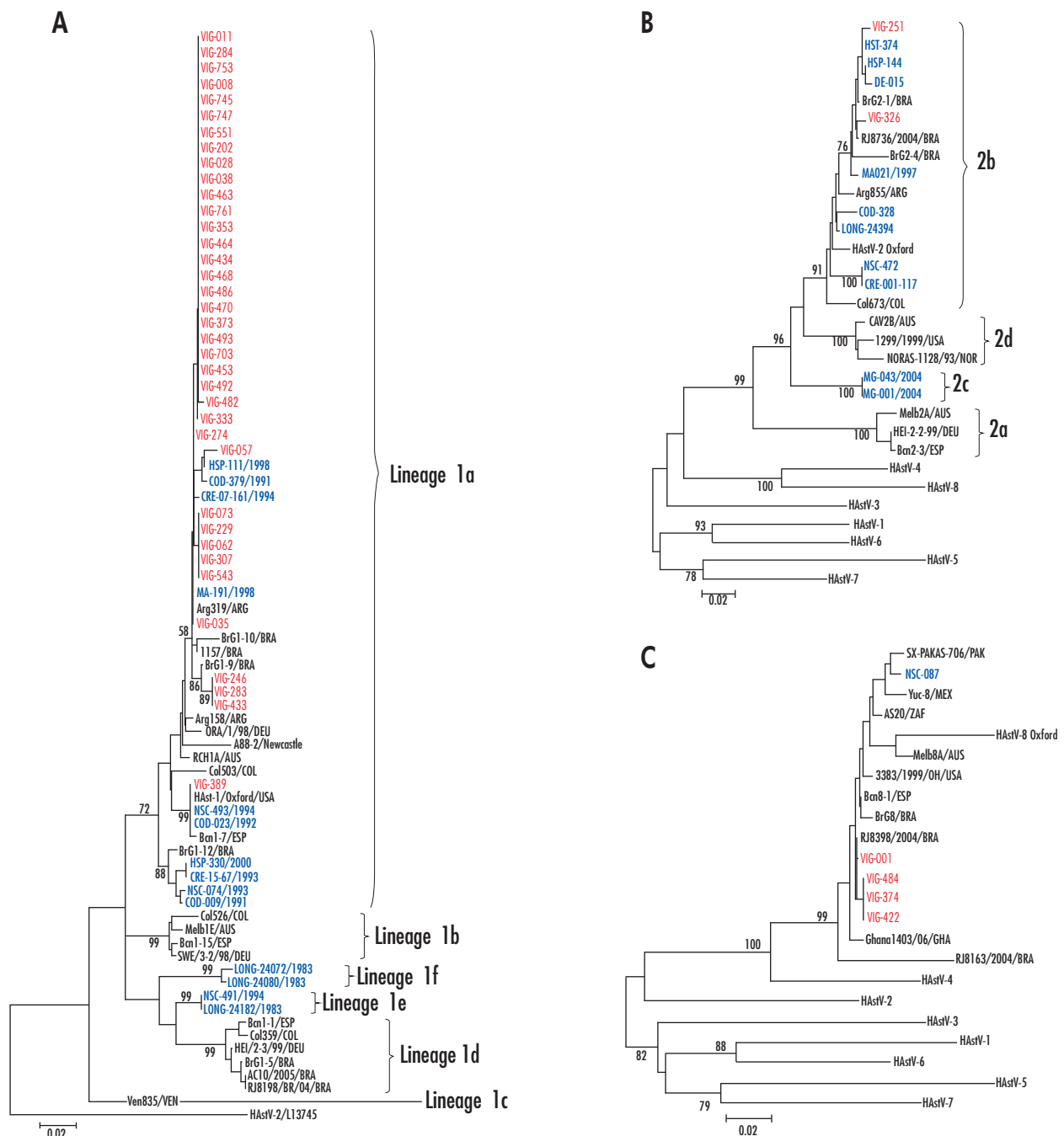


Figura 2 – Dendrograma da região parcial de ORF2 dos astrovírus tipo 1 (A), tipo 2 (B) e tipo 8 (C) amplificados de 45 pacientes de Belém, Estado do Pará, Brasi, de março a setembro de 2003. As cepas prototípicas são apresentadas no dendrograma juntamente com cepas de outras localidades. O número acima de cada ramo corresponde ao valor de bootstrap. A barra é proporcional à distância genética. As amostras coletadas em Belém em 2003 (VIG) estão em vermelho; as amostras coletadas na mesma cidade anteriormente estão em azul

As amostras classificadas como NoVs/GII-4 foram agrupadas em três sub-linhagens distintas: GII-4b "Nova variante" (2/29; 6,9%), GII-4c (26/29; 89,6%) e GII-4d (1/29; 3,4%). A divergência média observada entre as amostras classificadas como NoV GII-4c e GII-4b "Nova variante" foi de 0,5% e 2,9%, respectivamente, e com o protótipo específico foi de 3,1% (GII-4b "Nova variante"), 3% (GII-4c), 4,9% (GII-4d) e 11,3% (GI-4). As análises envolvendo somente amostras de Belém demonstraram uma divergência média de 9,6% entre GII-4c e GII-4d, e 16,4% entre GII-4b e GII-4d. Em relação à GI-4, esta variação foi maior que 49,3%. Uma pequena divergência foi observada quando os espécimes classificados no genogrupo GII-4 foram analisados com relação à sequência de aminoácidos (dados não mostrados).

Entre os SaVs, uma variação mínima foi observada dentro de cada um dos três genogrupos detectados: GII-1 (0,9%), GI-2 (0,3%) e GI-1 (3,1%). Em relação aos protótipos, a divergência média foi: GII-1 (4,1%), GI-2 (10,3%) e GI-1 (10,3%). Usando a sequência de aminoácidos do protótipo Bristol (AJ 249939; aminoácido 1460 a 1555) como referência, muitas substituições foram notadas, caracterizando os diversos genogrupos/genótipos analisados. Contudo, nenhuma substituição exclusiva foi observada com relação às amostras de Belém (dados não mostrados).

Todas as cepas de HAsV detectadas neste estudo pertenciam à linhagem 1a e divergiram de 0 - 3,6% (média de 0,6%) e 2,7% em relação ao protótipo Oxford HAsV-1. Nenhuma substituição significativa de aminoácido foi observada para a região analisada (dados não mostrados).

Os espécimes deste estudo foram provenientes de 21 hospitais e 11 unidades de saúde. A comparação das taxas de positividade obtidas nos hospitais para NoVs (13,2% - 37/281), SaVs (5,3% - 15/281) e HAsVs (14,6% - 41/281) com as das unidades de saúde - 4,2% (1/24), 0% e 16,7% (4/24), respectivamente - não revelou diferença estatística significativa quando aplicado o teste de Fisher ($p < 0.05$). No entanto, quando considerados juntos NoVs e SaVs (como HuCVs), esta diferença foi significativa ($p = 0.04$).

A tabela 2 demonstra a percentagem de positividade obtida para NoVs, SaVs e HAsVs em casos de gastroenterites observados durante o período de estudo (março a setembro de 2003). Verificaram-se picos de incidência para NoVs em maio (13/43; 30,2%); SaVs em junho (4/50; 8,0%) e julho (5/64; 7,8%); e HAsVs em março (8/16; 50%) e julho (14/64; 21,9%).

A distribuição por faixa etária dos casos positivos para NoVs e SaVs e HAsVs estão demonstrados na tabela 3. A maior taxa de detecção para os NoVs foi verificada em crianças com 6 a 12 meses de idade (17,1%), e, para os SaVs, a faixa etária foi maior, 24 a 30 meses (10,7%). Com relação aos HAsVs as taxas foram semelhantes (19,0% e 18,2%) para as idades de 0 a 6 e 12 a 18 meses de vida.

A maioria dos espécimes foi coletada no período de 42 h da hospitalização ou do atendimento nas unidades de saúde. Os principais sintomas observados nos casos positivos para essas viroses foram: diarreia, vômitos, febre e desidratação, porém sintomas similares foram observados nos casos negativos (dados não mostrados).

Tabela 2 – Distribuição mensal de cepas de norovírus, sapovírus e astrovírus detectadas em 305 espécimes fecais de crianças diarreicas de Belém, Pará, de março a setembro de 2003

Mês	Total de amostras	Calicivírus humanos		Astrovírus Pos (%)
		Norovírus Pos (%)	Sapovírus Pos (%)	
Março	16	2 (12,5)	1 (6,3)	8 (50)
Abril	42	2 (4,8)	–	3 (7,1)
Maio	43	13 (30,2)	1 (2,3)	5 (11,6)
Junho	50	7 (14)	4 (8,0)	8 (16)
Julho	64	9 (14,1)	5 (7,8)	14 (21,9)
Agosto	44	5 (11,4)	2 (4,5)	2 (4,5)
Setembro	46	–	2 (4,3)	5 (10,9)
Total	305	38 (12,5)	15 (4,9)	45 (14,7)

Observações: Três amostras positivas para calicivírus não foram incluídas por não terem sido sequenciadas;
Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero.
Dados não arredondados.

Tabela 3 – Frequência de astrovírus, norovírus e sapovírus humanos em 305 espécimes fecais de crianças diarreicas, de acordo com a idade, de Belém, Pará, de março a setembro de 2003

Meses de idade	Total de amostras	Calicivírus humanos		Astrovírus Pos (%)
		Norovírus Pos (%)	Sapovírus Pos (%)	
0-6	42	1 (2,4)	–	8 (19,0)
>6-12	82	14 (17,1)	3 (3,7)	11 (13,4)
>12-18	77	11 (14,3)	5 (6,5)	14 (18,2)
>18-24	56	8 (14,3)	4 (7,1)	8 (14,3)
>24-30	28	2 (7,1)	3 (10,7)	1 (3,6)
>30-36	20	2 (10,0)	–	3 (15,0)
Total	305	38 (12,5)	15 (4,9)	45 (14,7)

Observações: Três amostras positivas para calicivírus não foram incluídas por não terem sido sequenciadas;
Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero.
Dados não arredondados.

DISCUSSÃO

No presente estudo, pelo menos um agente viral foi detectado em 31,5% das amostras testadas. Esse resultado foi um pouco superior à taxa de 29% encontrada

em uma vigilância conduzida durante cinco anos na Província de Gyeonggi, Coréia do Sul²². As taxas de detecção obtidas em Belém para HuCVs, NoVs, SaVs e HAsVs foram de: 18,4%, 12,5%, 4,9% e 14,7%, respectivamente. Em hospitais de Campo Grande (7,6%), Goiânia e Brasília-DF (8,6%) e Salvador (9%), as taxas obtidas para os HuCVs foram inferiores às registradas em Belém^{1,4,48}. Quanto aos NoVs, a positividade observada (12,5%) foi menor que as registradas em crianças da Coréia (36,2%) e Espírito Santo (39,7%), porém semelhante às encontradas em dois estudos conduzidos no Rio de Janeiro (14,5% e 20%) e São Paulo (15,7%) e superiores às de uma pesquisa realizada na Tailândia (6,5%)^{24,26,28,37,41,44}.

A investigação de SaVs no Brasil ainda é limitada em razão da maioria dos trabalhos utilizarem iniciadores específicos para os NoVs. Contudo, estes vírus já foram detectados em uma amostra de Salvador (0,7%) e descritos em espécimes diarréicos coletados em um hospital (5,9%) e em uma unidade de saúde (3%) de Belém em percentuais similares ao do estudo atual (4,9%)^{29,40,48}. Este percentual foi semelhante aos relatados na Tailândia e Austrália (4,8% e 4,1%, respectivamente) e menor que os da Índia (10,2%)^{20,21,35}. Nesta pesquisa, três amostras que se apresentaram positivas para HuCVs, foram negativas para NoVs (quando se utilizou iniciadores específicos), sugerindo que elas provavelmente pertenciam ao gênero SaVs, o que aumentaria a taxa de detecção desses vírus para 5,9%.

A taxa de positividade para os HAsV (14,7%) foi semelhante às registradas em ambulatórios e/ou hospitais da Coréia do Sul, Cidade de Córdoba e Rio de Janeiro (11%, 12,4% e 14%, respectivamente)^{19,22,45}. Este percentual foi maior que os obtidos anteriormente em diferentes estudos conduzidos em Belém durante 18 anos envolvendo hospitais, unidade de saúde, comunidade e creche, que variaram entre 2,7% e 9,9%¹⁵.

O dendrograma de NoVs mostrado no presente estudo foi construído com base nas sequências obtidas com os iniciadores 289/290, que codificam parte da RNA polimerase, e que foram usados por detectarem tanto os NoVs como os SaVs. Em contrapartida, a maioria dos estudos realizados no Brasil utiliza outros pares de iniciadores que amplificam a região B da RNA polimerase e são específicos para NoVs. Como esses iniciadores codificam a mesma região da RNA polimerase, foi possível comparar os resultados desta pesquisa com outras conduzidas no Brasil. No presente estudo, o genótipo GII-4 foi detectado em 96,7% das amostras analisadas. Estes resultados confirmam os obtidos no Rio de Janeiro (64%) e em São Paulo (76,9%)^{7,44}. Este genótipo também foi o mais encontrado em amostras coletadas em Belém nos anos de 1992-1994 e 1998-2000 (dados não mostrados). Muitos artigos relatam um aumento significativo na circulação de cepas de GII-4 desde a década de 1990, com uma grande variabilidade genética, relacionados tanto a surtos extensivos como a casos esporádicos^{5,31,43}.

Três diferentes genótipos de SaVs foram encontrados neste estudo, sendo o GII-1 o mais prevalente (66,7%). Este também foi detectado em uma amostra de Salvador, o único outro lugar no Brasil em que este vírus foi descrito⁴⁸. No entanto, em estudos realizados anteriormente em Belém⁴⁰, o genótipo mais frequente foi o GI-1. Uma ocorrência semelhante desta cepa também foi observada em Bangladesh, em crianças diarréicas⁸.

Três diferentes genótipos de HAsVs cocircularam em Belém durante os seis meses de estudo, sendo HAsV-1 o mais prevalente (82,2%), como também relatado em outros locais^{6,16,39,45}. A circulação simultânea de outros genótipos foi observada em outras regiões do Brasil e do mundo^{6,10,36,39}. Todas as amostras positivas para HAsVs-1 foram classificadas como sendo da linhagem 1a. Pesquisas anteriores realizadas em Belém demonstraram que 93,8% (76/81) das cepas de HAsVs-1 detectadas ao longo de 18 anos (1982-2000) pertenciam à linhagem 1a¹⁵. Porém, estudos conduzidos em outras localidades do Brasil, como nas cidades do Rio de Janeiro e Goiânia, de 2003 a 2005, demonstraram a circulação da linhagem 1d^{38,45}. Os dados obtidos neste trabalho, a partir de amostras coletadas em 2003, mostraram que não ocorreu nenhuma alteração em Belém, visto que a linhagem 1a continuou sendo a única em circulação. Vale ressaltar que o HAsVs tipo 8 foi encontrado em 8,9% das amostras. Este genótipo é considerado raro, embora já tenha sido observado em outros estudos realizados em Belém, porém em menor frequência. Resultados semelhantes foram observados no Rio de Janeiro^{17,45}.

Coinfecção envolvendo os três vírus foi verificada em 1,6% dos casos. Esta situação é relativamente comum em episódios de gastroenterite, conforme descrito por outros autores^{9,18,25,36,44}. Este fato provavelmente reflete as precárias condições de saneamento e o baixo nível socioeconômico a que essas crianças pertencem.

Este estudo envolveu amostras coletadas em hospitais e unidades de saúde. Foi observada uma maior frequência destes vírus nos nosocômios, o que indica maior gravidade da associação desses agentes a quadros de gastroenterite. No entanto, o número de espécimes (42) coletados nas unidades de saúde foi muito pequeno para permitir uma melhor análise.

Observou-se também que os NoVs foram mais prevalentes entre crianças de 6 a 12 meses, enquanto que os SaVs o foram entre as de 24-30 meses de idade. Estes dados estão de acordo com os descritos na literatura, o que indica que os SaVs são mais frequentemente detectados em crianças de maior idade¹². Um padrão de sazonalidade para esses três agentes não pôde ser definido porque este estudo envolveu somente seis meses de vigilância.

Deste modo, os dados obtidos demonstram a importância destes vírus nos casos de gastroenterite aguda tanto em hospitais como em unidades de saúde. A detecção de SaVs reforça a necessidade de se estabelecer um sistema de monitoramento para avaliar o impacto destes vírus em

outras regiões do Brasil. A caracterização molecular desses agentes demonstrou que diferentes genótipos circulam ao longo do tempo (ou seja, não foram os mesmos nesta pesquisa e em outras previamente realizadas em Belém). Portanto, estudos moleculares adicionais são necessários para monitorar essas variações. A introdução recente de vacina para RV-A no Programa Nacional de Imunização Pediátrica do Brasil reforça a necessidade de investigações permanentes sobre estas viroses.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio técnico prestado por Maria Sílvia Sousa de Lucena, Jones Anderson Monteiro Siqueira, Ian Carlos Lima, Dielle Monteiro Teixeira e Jefferson Oliveira, bem como a toda equipe de campo e aos médicos que trabalharam durante o projeto "Vigilância Intensiva das Diarréias em Hospitais". Este trabalho teve o apoio financeiro do IEC/SVS/MS.



Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil

ABSTRACT

The importance of norovirus (NoVs), sapovirus (SaVs) and human astrovirus (HAstVs) as causes of gastroenteritis outbreaks is already well-defined, but a few studies have described sporadic cases of acute gastroenteritis caused by these viral entities. The aim of this study was to determine the role of these viruses in the etiology of acute gastroenteritis in children enrolled to participate in hospital – and emergency department – based intensive surveillance carried out in Belém, Brazil, from March to September 2003. A total of 305 stool specimens from patients with severe gastroenteritis were collected and screened by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR), using the specific primers Mon 269 and Mon 270 for HAstVs, p289 and p290 for human calicivirus (HuCVs), and Mon 431/433 and Mon 432/434 for NoVs. Sequencing of RT-PCR HAstV, HuCV and NoV amplicons was carried out using the same primers. Of the 305 samples tested, 96 (31.5%) were positive, with 51 diagnosed as HuCVs, 40 as HAstVs and five as mixed infections. Of the 56 (18.4%) HuCVs sequenced, 30 were NoVs (9.8%) of genogroups GI-4 and GII-4, and 15 (4.9%) were SaVs of types GI-1, GI-2 and GII-1. HAstVs, including genotypes 1, 8 and 2, were detected in 45 (14.7%) samples. This study has highlighted the importance of these viruses as causes of acute gastroenteritis and established the circulation of different genotypes during the study period. These results reinforce the need for establishing an intensive surveillance for gastroenteritis caused by these viruses to assess the burden of disease and to monitor the circulation of genotypes.

Keywords: Norovirus; Sapovirus; Human, Astrovirus; Gastroenteritis; Molecular Sequence Data.

Caracterización molecular de norovirus, sapovirus y astrovirus en niños con gastroenteritis aguda en Belém (Pará, Brasil)

RESUMEN

La importancia de los norovirus (NoVs), sapovirus (SaVs) y astrovirus humanos (HAstVs) como causa de brotes de gastroenteritis ya está bien definida. Sin embargo, pocos estudios han descrito casos esporádicos de gastroenteritis aguda causados por esos agentes. El objetivo de este estudio fue el de determinar el papel de esos virus en la etiología de las gastroenteritis agudas en niños atendidos durante una vigilancia intensiva realizada en hospitales y ambulatorios de Belém, Brasil, de marzo a setiembre de 2003. Un total de 305 especímenes fecales de pacientes con gastroenteritis grave fueron colectados y analizados por reacción en cadena de polimerasa precedida de transcripción reversa (RT-PCR), utilizando iniciadores específicos Mon 269 y Mon 270 para los HAstVs; p289 y p290 para los calicivirus humanos (HuCVs); y Mon 431/433 y Mon 432/434 para los NoVs. Secuenciación de los amplicones de HAstV, HuCV y NoV, obtenidos por RT-PCR, se realizó usando los mismos iniciadores. De las 305 muestras analizadas, 96 (31,5%) fueron positivas, 51 diagnosticadas como HuCVs, 40 como HAstVs y cinco infecciones mixtas. De las 56 (18,4%) muestras de HuCVs secuenciadas, 30 fueron NoVs (9,8%) pertenecientes a los genogrupos GI-4 y GII-4, y 15 (4,9%) fueron SaVs de los grupos GI-1, GI-2 y GII-1. HAstVs fueron detectados en 45 (14,7%) muestras, incluyendo los genotipos 1, 8 y 2. Esta investigación resalta la importancia de estas virosis como causa de gastroenteritis aguda y demuestra la circulación de diferentes genotipos durante el período de estudio. Estos resultados refuerzan la necesidad de establecer una vigilancia intensiva de las gastroenteritis causadas por estos virus, de forma a poder evaluar el impacto de la enfermedad y monitorear los genotipos circulantes.

Palabras clave: Norovirus; Sapovirus; Astrovirus Humano; Gastroenteritis; Datos de Secuencia Molecular.

REFERÊNCIAS

- 1 Andreasi MS, Cardoso DD, Fernandes SM, Tozetti IA, Borges AM, 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 Nov;103(7):741-4.
- 2 Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Jan;14(1):15-37.
- 3 Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 1990 Mar;28(3):495-503.
- 4 Borges AM, Teixeira JM, Costa PS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco RC, et al. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Nov;101(7):721-4.
- 5 Bull RA, Tu ET, Mclver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II. 4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol*. 2006 Feb;44(2):327-33.
- 6 Cardoso DDP, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Martins RM, Leite JPG. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiania, Goiás, Brazil. *Med Sci Monit*. 2002 Sep;8(9):CR624-8.
- 7 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 Nov;44(11):3947-53.
- 8 Dey SK, Phan TG, Nguyen TA, Nishio O, Salim AF, Yagy F, et al. Prevalence of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh during 2004-2005. *J Med Virol*. 2007 May;79(5):633-8.
- 9 Dove W, Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneux ME, Nakagomi O, et al. Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol*. 2005 Dec;77(4):522-7.
- 10 Espul A, Martinez N, Noel JS, Cuello H, Abrile C, Grucci S, et al. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *J Med Virol*. 2004 Jan;72(1):75-82.
- 11 Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, et al. Epidemiological and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis*. 2002 Jul;186(1):1-7.
- 12 Farkas T, Deng X, Ruiz-Palacios G, Morrow A, Jiang X. Development of an enzyme immunoassay for detection of sapovirus-specific antibodies and its application in a study of seroprevalence in children. *J Clin Microbiol*. 2006 Oct;44(10):3674-9.
- 13 Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Family Astroviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on the taxonomy of viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005. p. 859-64.
- 14 Felsenstein J. PHYLIP, Version 3.57c. Seattle, WA: Department of Genetics, University of Washington; 1995.
- 15 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 Nov;129(2):166-74.
- 16 Gabbay YB, Linhares AC, Cavalcante-Pepino EL, Nakamura LS, Oliveira DS, Silva LD, et al. Prevalence of human astrovirus genotypes associated with acute gastroenteritis among children in Belém, Brazil. *J Med Virol*. 2007 May;79(5):530-8.
- 17 Gabbay YB, Linhares AC, Oliveira DS, Nakamura LS, Mascarenhas JD, Gusmão RH, et al. First detection of a human astrovirus type 8 in a child with diarrhea in Belém, Brazil: comparison with other strains worldwide and identification of possible three lineages. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Jun;102(4):531-4.
- 18 Gabbay YB, Luz CR, Costa IV, Cavalcante-Pepino EL, Sousa MS, Oliveira KK, et al. Prevalence and genetic diversity of astroviruses in children with and without diarrhea in São Luís, Maranhão, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Nov;100(7):709-14.
- 19 Giordano MO, Martinez LC, Isa MB, Paez Rearte M, Nates SV. Childhood astrovirus-associated diarrhea in the ambulatory setting in a public hospital in Cordoba City, Argentina. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2004 Mar-Apr;46(2):93-6.
- 20 Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, et al. Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar;42(3):1305-7.
- 21 Hansman GS, Takeda N, Katayama K, Tu ET, Mclver CJ, Rawlinson WD, et al. Genetic diversity of sapovirus in children, Australia. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jan;12(1):141-3.
- 22 Huh JW, Kim HW, Moon SG, Lee JB, Lim YH. Viral etiology and incidence associated with acute gastroenteritis in a 5-year survey in Gyeonggi province, South Korea. *J Clin Virol*. 2009 Feb;44(2):152-6.
- 23 Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods*. 1999 Dec;83(1-2):145-54.

- 24 Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, Yeephoon T, Khamrin P, Ushijima H. Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapovirus, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand. *J Med Virol.* 2009 Feb;81(2):345-53.
- 25 Klein EJ, Boster DR, Stapp JR, Wells JG, Qin X, Clausen CR, et al. Diarrhea etiology in a Children's Hospital Emergency Department: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2006 Oct;43(7):807-13.
- 26 Koh H, Baek SY, Shin JI, Chung KS, Je YM. Coinfection of viral agents in Korean children with acute watery diarrhea. *J Korean Med Sci.* 2008 Dec; 23(6):937-40.
- 27 Méndez E, Arias CF. Astroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 981-1000.
- 28 Morillo SG, Cilli A, Carmona RC, Timenetsky MC. Identification and molecular characterization of norovirus in São Paulo State, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2008 Dec;39(4):619-22.
- 29 Nakamura LS, Oliveira DS, Silva PF, Lucena MS, Mascarenhas JD, Gusmão RH, et al. Molecular characterization of calicivirus in feces of children with acute diarrhea, attending a public hospital, in Belém, Pará. In: XVII National Meeting of Virology; 2006 19-22; Campos do Jordão: Sociedade Brasileira de Virologia; 2006. p. 95. (*Virus Reviews & Research*; vol. 11; supl. 1).
- 30 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 Apr;33(4):797-801.
- 31 Okada M, Ogawa T, Yoshizumi H, Kubonoya H, Shinozaki K. Genetic variation of the norovirus GII-4 genotype associated with a large number of outbreaks in Chiba prefecture, Japan. *Arch Virol.* 2007;152(12):2249-52.
- 32 Parashar UD, Gibson CJ, Breese JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2006 Feb;12(2):304-6.
- 33 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 Aug;14(8):1224-31.
- 34 Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, et al. Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan. *Infect Genet Evol.* 2007 Jul;7(4):542-6.
- 35 Rachakonda G, Choudekar A, Parveen S, Bhatnagar S, Patwari A, Broor S. Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children with acute sporadic gastroenteritis in New Delhi, India. *J Clin Virol.* 2008 Sep;43(1):42-8.
- 36 Resque HR, Munford V, Castilho JG, Schmich H, Caruzo TA, Rácz ML. Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Dec;102(8):969-74.
- 37 Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, Miagostovich MP, et al. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Mar;103(2):201-6.
- 38 Silva PA, Cardoso DD, Schreier E. Molecular characterization of human astroviruses isolated in Brazil, including the complete sequences of astrovirus genotypes 4 and 5. *Arch Virol.* 2006 Jul;151(7):1405-17.
- 39 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 Jul;104(4):655-8.
- 40 Siqueira JM, Aragão GC, Nascimento IS, Oliveira DS, Santos MC, Lima IC, et al. Estudos da prevalência de calicivírus humanos em crianças com gastroenterite. *Congresso Norte Nordeste de Infectologia*; 2008 nov. 28-30; Belém: Sociedade Brasileira de Infectologia; 2008.
- 41 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 Aug;13(8):1244-6.
- 42 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007 Aug;24(8):1596-9.
- 43 Tu ET, Bull RA, Greening GE, Hewitt J, Lyon MJ, Marshall JA, et al. Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. *Clin Infect Dis.* 2008 Feb;46(3):413-20.
- 44 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, 2004. *Pediatr Infect Dis J.* 2007 Jul;26(7):602-6.
- 45 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 Jul;79(7):939-44.
- 46 Walter JE, Mitchell DK, Guerrero ML, Berke T, Matson DO, Monroe SS, et al. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a Periurban community of Mexico City. *J Infect Dis.* 2001 Mar;183(5):681-6.

- 47 Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.* 2003 Apr;9(4):247-62.
- 48 Xavier MP, Oliveira SA, Ferreira MS, Victoria M, Miranda V, Silva MF, et al. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2009 May; 42(5):438-44.

Recebido em / Received / Recibido en: 31/7/2009

Aceito em / Accepted / Aceito en: 19/10/2009