

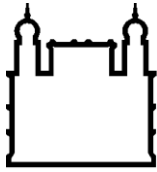
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutoramento em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROVÍRUS DETECTADOS EM  
CRIANÇAS COM DIARREIA AGUDA E EM AMOSTRAS AMBIENTAIS EM  
MOÇAMBIQUE

DIOCRECIANO MATIAS BERO

Rio de Janeiro  
23 de julho de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*DIOCRECIANO MATIAS BERO*

Caracterização molecular de enterovírus detectados em crianças com diarreia aguda e em amostras ambientais em Moçambique

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em Medicina Tropical

**Orientador (es):** Prof. Dr. Edson Elias da Silva  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Nilsa Olivia Razão de Deus

**RIO DE JANEIRO**

23 de julho de 2020

Bero, Diocreciano Matias.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROVÍRUS DETECTADOS EM CRIANÇAS COM DIARREIA AGUDA E EM AMOSTRAS AMBIENTAIS EM MOÇAMBIQUE / Diocreciano Matias Bero. - Rio de Janeiro, 2020.

120 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2020.

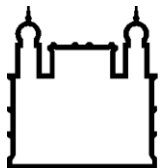
Orientador: Edson Elias da Silva.

Co-orientadora: Nilsa Olivia Razão de Deus.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. diarreia. 2. enterovírus. 3. fezes. 4. vigilância ambiental. 5. esgoto. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

### ***DIOCRECIANO MATIAS BERO***

#### **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROVÍRUS DETECTADOS EM CRIANÇAS COM DIARREIA AGUDA E EM AMOSTRAS AMBIENTAIS, EM MOÇAMBIQUE**

**Orientador (es): Prof. Dr. Edson Elias da Silva**  
**Profª. Dra. Nilsa Olivia Razão de Deus**

**Avaliada e aprovada em:** 23/07/2020, pela banca examinadora, composta pelos seguintes membros,

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Horta** – Presidente (IOC/FIOCRUZ)

**Profª. Dra. Gina Peres Lima dos Santos** (UFF/RJ)

**Prof. Dr. Tulio Machado Fumian** (IOC/FIOCRUZ)

**Profª. Dra. Carmen Baur Vieira** (UFF/RJ)

**Profª. Dra. Maria de Lourdes Aguiar** (IOC/FIOCRUZ)

**Profª. Dra. Cláudia Lamarca Vitral** – Suplente (UFF/RJ)

**Profª. Dra. Jaqueline Mendes de Oliveira** – Suplente (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 23 de julho de 2020

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho ao meu filho Pietro Bero e a minha esposa Rosa Moiane pelo carinho, suporte, conforto, e saudades durante o tempo da minha ausência física.*

*Aos meus pais, Languitone Bero e Inácia Alfredo Matias, por terem me ensinado a acreditar nos sonhos e serem exemplos de resiliência.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela graça, dom da vida e pelos anjos que colocou em meu caminho ao longo desta jornada, para que fosse possível chegar ao fim deste processo de aprendizado.

Aos meus mestres, Doutor Edson Elias da Silva e Doutora Nilsa de Deus, que não mediram esforços na orientação e partilha de experiências ao longo da jornada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Academia de Ciências para o Mundo em Desenvolvimento (TWAS), e aos projetos *European Foundation Initiative into African Research in Neglected Tropical Diseases* (EFINTD) e *Building institutional capacity at INS to strengthen the evidence base of the public health system in Mozambique* (BCMINS), pelo financiamento em diversas atividades da tese.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PGMT), pelo carinho, atendimento sempre que preciso, e um profundo agradecimento a Doutora Martha Cecília Suárez Mutis, por ter me recebido no programa e me acompanhado, ao longo destes anos. Ao corpo docente do programa, que partilhou de forma sábia, útil e franca os conhecimentos nestes anos de formação acadêmica.

Ao Ministério e Instituto Nacional de Saúde (INS) de Moçambique, em particular ao grupo de Vigilância Nacional de Diarreias, pela oportunidade, trabalho em equipe, dedicação e colaboração no desenvolvimento desta tese.

Aos colegas do Laboratório de Virologia do INS, pela ajuda e suporte técnico. À família do Laboratório de Enterovírus da Fundação Oswaldo Cruz, pelo acolhimento sempre prestativo e amável.

Ao colo, à voz consoladora dos meus pais, pelo afeto, oração e incentivo. Às queridas irmãs, Victoria, Nerlete, Cremilda e Clésia, pelo apoio incondicional concedido durante este período.

Aos que neste período ajudaram-me a tornar esta caminhada mais dócil e afável, os colegas do programa de PGMT, e do INS, em particular a: Jerónimo Langa, Raina Machado, Adolfo Vubil, Nédio Jonas, Tufária Mussá, Adilson Bauhofer, Sheila Nhassengo e Benilde Munela, que não mediram esforços para me auxiliar, sempre que precisei.

Aos voluntários que participaram de forma cordial neste trabalho e ao Conselho Autárquico da Cidade de Maputo, pela colaboração para a coleta de amostras ambientais.

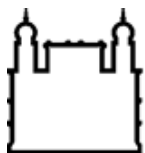
Aos que de forma incansável participaram desta jornada, tornando-a mais aprazível, e que me esqueci de mencionar, meu sincero agradecimento "Macolo coto tatenda".

A vigilância  
é uma ordem

Enterovirus todos têm,  
por isso, haja amostras

Amostras para vigilância  
enterovirus buscais

*"in obras incompletas"*  
Diocreciano Matias Bero



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

### RESUMO

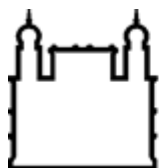
#### CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROVÍRUS DETECTADOS EM CRIANÇAS COM DIARREIA AGUDA E EM AMOSTRAS AMBIENTAIS EM MOÇAMBIQUE

Diocreciano Matias Bero

Os enterovírus (EV) são vírus de transmissão predominantemente entérica, presentes em todas as partes do mundo e são agentes etiológicos de infecções que variam de casos assintomáticos a casos de gastroenterite aguda (GA) e infecções no sistema nervoso central. Devido aos diferentes rumos que as infecções por esses microrganismos podem tomar no organismo, as vigilâncias epidemiológica e ambiental dos EV são importantes ferramentas para definição de políticas públicas de prevenção e controle. O objetivo deste estudo foi detectar e caracterizar EV em amostras clínicas e ambientais coletadas em Moçambique entre 2014 e 2018. Foram realizados dois estudos, um em casos de diarreia e outro em águas de esgoto. No estudo de casos de diarreia, 327 amostras de fezes de crianças menores de cinco anos, internadas com GA entre junho de 2014 e março de 2018 em unidades de saúde das províncias de Maputo, Nampula, Sofala e Zambézia foram estudadas. As amostras foram testadas por RT-PCR em tempo real, inoculadas em cultivo celular (RD e HEp2C) e os tipos de EV foram identificados por sequenciamento nucleotídico. A frequência dos EV detectados foi de 15,9% (52/327) das amostras. A faixa etária dos 12 a 23 meses foi a mais afetada ( $p < 0,045$ ). Verificou-se maior positividade para aos enterovirus nas amostras com resultados negativos para outros agentes entéricos da GA ( $p < 0,011$ ). A espécie *Enterovirus B* foi a mais prevalente (40,4%), seguida das espécies C (32,7%) e A (26,9%). Vinte e seis tipos de enterovírus foram detectados, sendo EV-A119 e EV-C99 os mais frequentes (17,3% e 15,4%, respetivamente). O quadro de GA por enterovírus mostrou-se severo, principalmente na faixa dos 12 a 23 meses, apresentando maior período de duração dos sintomas e tempo de hospitalização. Co-deteção entre enterovírus e outros patógenos entéricos foram observadas em 17,3% (9/52) dos casos. A temperatura apresentou correlação positiva com a infecção por enterovírus ( $p < 0,006$ ). Para o estudo ambiental, amostras de esgoto bruto foram coletadas na cidade de Maputo, Moçambique, entre janeiro e novembro de 2018. As amostras foram concentradas pelo método de absorção de sílica e os concentrados inoculados nas linhagens celulares RD e L20B para isolamento viral e posterior RT-PCR e sequenciamento. Das 63 amostras analisadas, 25 (39,7%) foram positivas para enterovírus, com alta frequência da espécie *Enterovirus B* (96%). Coxsackievirus B3 e Echovirus 11 foram os tipos mais frequentes (64%). A análise filogenética das amostras ambientais revelou que os isolados deste estudo estavam intimamente relacionados a cepas associadas a doenças neurológicas. De uma maneira geral, este estudo identificou uma grande variedade de enterovírus, inclusive de espécies incomuns, nos dois tipos de amostras estudadas de Moçambique. Os resultados reforçam a associação de EV a casos de GA e a indicação da vigilância ambiental como uma ferramenta valiosa para monitorar a circulação silenciosa e o surgimento ou ressurgimento de EVs, fornecendo informações relevantes no contexto da erradicação da poliomielite.

**Palavras chaves:** diarreia, enterovírus, fezes, vigilância ambiental, esgoto.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

### ABSTRACT

#### MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ENTEROVÍRUSES DETECTED IN CHILDREN WITH ACUTE DIARRHEA AND ENVIRONMENTAL SAMPLES IN MOZAMBIQUE

Diocreciano Matias Bero

Enteroviruses (EV) are enteric pathogens showing global distribution and are etiologic agents of infections ranging from asymptomatic cases to cases of acute gastroenteritis (AGE) and infections in the central nervous system. Due to different clinical effects of that EV infection in the organism, active surveillance system is relevant to provide important information and support to public health policies for prevention and control. The purpose of this study was to characterize EV infection in clinical and environmental samples collected in Mozambique between 2014 and 2018. Two studies were carried out, one in cases of diarrhea and the other in sewage. In the study of cases of diarrhea, 327 fecal samples from children less than 5 years old hospitalized with AGE in health care units in Maputo, Nampula, Sofala and Zambézia provinces from Mozambique between June 2014 and March 2018. Samples were tested by real-time RT-PCR, viral isolation (RD and HEp2C) and subsequent nucleotide sequence of types. Overall, the frequency of EV positive was 15.9% (52/327). The age group from 12 to 23 months was the most affected ( $p < 0.045$ ). Higher positivity of enteroviruses was found in samples with negative results for other enteric pathogens ( $p < 0.011$ ). *Enterovirus B* was the most prevalent species (40.4%), followed by *Enterovirus C* with (32.7%) and finally *Enterovirus A* with (26.9%). Twenty-six types of enteroviruses were detected, and EV-A11 and EV-C99 serotypes the most frequent (17.3% and 15.4, respectively). The EV AGE cases were severe, especially in the 12 to 23-month aged range, with a longer duration of symptoms and hospitalization. Co-detection between enterovirus and other agents was found in 17.3% (09/52). Temperature was positively correlated with enterovirus infection ( $p < 0.006$ ). For the environmental surveillance, sewage samples were collected in the city of Maputo, Mozambique, between January and November 2018. Viral concentration was performed by the silica absorption method and concentrates were inoculated in the RD and L20B cell lines for viral isolation, followed by RT-PCR analysis and subsequent nucleotide sequencing. Of the 63 analyzed samples, 25 (39.7%) were positive for enterovirus, with a high frequency of *Enterovirus B* species (96%). The coxsackievirus B3 and echovirus 11 were the most frequent types (64%). Phylogenetic analysis of environmental samples revealed that the isolates were closely related to strains associated with neurological diseases. This study identified a wide variety of enteroviruses, including unusual types, in both types of samples studied in Mozambique. The results reinforce the high frequency of EV among cases of GA and the indication of environmental surveillance as a powerful tool to monitor silent viral circulation and the appearance or resurgence of EV, providing valuable information in the context of polio eradication.

**Keywords:** diarrhea, enterovirus, stool, environmental surveillance, sewage.

# ÍNDICE

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Enterovírus.....	2
1.1.1 Histórico dos enterovírus.....	2
1.1.2 Classificação taxonômica dos enterovírus .....	3
1.1.3 Estrutura dos enterovírus .....	5
1.1.4 Propriedades físico-químicas dos enterovírus .....	7
1.1.5 Ciclo replicativo dos enterovírus .....	7
1.1.6 Propriedades antigênicas dos enterovírus .....	9
1.1.7 Patogenia da infecção pelos Enterovírus .....	10
1.1.8 Epidemiologia das infecções por enterovírus.....	11
1.1.9 Manifestações clínicas .....	12
1.1.10 Vigilância ambiental .....	14
1.1.11 Diagnóstico laboratorial.....	15
1.1.12 Prevenção, controle e tratamento .....	16
1.1.13 Descrição da saúde da criança moçambicana.....	18
1.1.14 Vigilância Nacional de Diarreias em Moçambique .....	19
1.2 JUSTIFICATIVA.....	20
2. OBJETIVO.....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2. Objetivos específicos .....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1. Área de estudo.....	22
3.2. Estudo com amostras clínicas.....	23
3.2.1. Aspectos éticos .....	23
3.2.2. Tipo de estudo e Amostragem .....	23
3.2.3. Tamanho amostral .....	24
3.2.4. Definição de casos, critérios de inclusão e exclusão .....	25
3.2.5 Processamento das amostras de fezes .....	25
3.2.6 Preparo de suspensões fecais.....	26

3.2.7	Extração de RNA viral.....	27
3.2.8	Reação de PCR em tempo real (qPCR) para detecção de enterovírus do gênero Enterovirus.....	27
3.2.9	Isolamento em cultura de células.....	27
3.2.10	Caracterização molecular de tipos dos enterovírus .....	28
3.2.10.1	Visualização dos amplicons por eletroforese em gel de agarose.....	29
3.2.10.2	Purificação dos produtos da PCR .....	29
3.2.10.3	Quantificação do DNA purificado .....	29
3.2.10.4	Reações de sequenciamento.....	30
3.2.10.5	Identificação dos tipos e análise filogenética dos enterovírus.....	30
3.2.11	Composição da casuística e análise da gravidade da diarreia.....	30
3.2.12.	Dados meteorológicos.....	31
3.2.13.	Análises estatísticas.....	31
3.3	Estudo ambiental .....	32
3.3.1.	Tipo de estudo e amostragem.....	32
3.3.2.	Processamento de amostras ambientais .....	34
3.3.3	Concentração de amostras .....	35
3.3.4	Inoculação das amostras ambientais em cultura celular .....	35
3.3.5	Caracterização molecular dos tipos dos enterovírus.....	36
3.3.6	Análises estatísticas.....	37
4.	RESULTADOS .....	38
4.1	Estudo com amostras clínicas.....	38
4.1.1.	Características sociodemográficas e clínicas dos participantes do estudo .....	38
4.1.2.	Detecção de enterovírus e sua associação à características sociodemográficas e clínicas dos participantes do estudo .....	41
4.1.3.	Gravidade da doença diarreica na infecção por enterovírus .....	45
4.1.4.	Distribuição geográfica e associação a fatores ambientais.....	47
4.1.5.	Enterovírus identificados e co-detecção em crianças com doença diarreica .....	50
4.1.6.	Análise filogenética dos enterovírus isolados nas amostras fecais.....	53
4.2.	Estudo Ambiental .....	58
5.	DISCUSSÃO.....	62
5.1	Estudo de casos de diarreia.....	62

5.2. Estudo ambiental .....	68
6. PERSPECTIVAS .....	71
7. CONCLUSÕES.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73
ANEXOS.....	85
ANEXO A. APROVAÇÃO PELO COMITÊ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE DE MOÇAMBIQUE.....	86
ANEXO B. APROVAÇÃO PELO COMITÊ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE DE MOÇAMBIQUE -ViNaDia .....	87
ANEXO C. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	88
ANEXO D. FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS.....	92
ANEXO E. ESCALA DE GRAVIDADE DA DIARREIA (RUUSKA E VESIKARI).....	97
ANEXO F. AUTORIZAÇÃO DO CONSELHO MUNICIPAL DA CIDADE DE MAPUTO.....	98
APÊNDICE .....	99
APÊNDICE A. INICIADORES E CONDIÇÕES UTILIZADAS NAS REAÇÕES .....	100
PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES NOS ÚLTIMOS ANOS .....	101
ARTIGOS SUBMETIDOS A PUBLICAÇÃO .....	103

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estimativas de óbitos por diarreia no mundo .....	1
Figura 1.2. Esquema ilustrativo dos enterovírus .....	6
Figura 1.3. Genoma dos enterovírus.....	7
Figura 1.4. Esquema ilustrativo do ciclo replicativo dos enterovírus.....	9
Figura 1.5. Patogênese da infecção por enterovírus.....	11
Figura 3.1. Mapa da África.....	22
Figura 3.2. Mapa de Moçambique.....	24
Figura 3.3. Fluxograma resumido do processamento das amostras de fezes .....	26
Figura 3.4. Pontos de coleta de amostras de esgoto bruto.....	33
Figura 3.4. Fluxograma resumido de processamento das amostras ambientais. ....	34
Figura 4.1. Detecção de enterovírus em crianças, segundo o ano de coleta em Moçambique, entre 2014 – 2018.....	41
Figura 4.2. Valores médios dos CT dos enterovírus detectados por qRT-PCR no período pré e pós introdução da vacina contra rotavírus .....	45
Figura 4.3. Distribuição temporal dos enterovírus e fatores ambientais na província de Maputo.....	48
Figura 4.4. Distribuição temporal dos enterovírus e fatores ambientais na província de Nampula.....	48
Figura 4. 5. Distribuição temporal dos enterovírus e fatores ambientais na província de Sofala.....	49
Figura 4.6. Distribuição temporal dos enterovírus e fatores ambientais na província de Zambézia. ....	49
Figura 4.7. Diagrama ilustrando a percentagem de tipos por espécie de enterovírus detectados nas amostras clínicas. ....	51
Figura 4.8. Espécies dos enterovírus identificados por ano.....	52
Figura 4.9. Co-detecção entre enterovírus e outros agentes patogênicos.....	53
Figura 4.10. Reconstrução filogenética de enterovírus espécie A .....	54
Figura 4.11. Reconstrução filogenética de enterovírus espécie B .....	56
Figura 4.12. Reconstrução filogenética de enterovírus espécie C.....	57
Figura 4.13. Distribuição temporal dos enterovírus isolados em amostras ambientais, segundo variações meteorológicas, na cidade de Maputo em 2018.....	60

Figura 4.14. Análise filogenética dos Enterovírus B isolados em amostras de água de esgoto da cidade de Maputo em Moçambique.....61

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1.1 Classificação dos Enterovírus.....	4
Quadro 3.1. Critérios de inclusão e exclusão do presente estudo.....	25
Quadro 4.1 Distribuição temporal por província e espécies dos isolados.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Descrição das características gerais da população de estudo .....	39
Tabela 4.2 Características sociodemográficas, análise bivariada e multivariada para infecção por enterovírus.....	42
Tabela 4.3 Características clínicas e análise bivariada para infecção por enterovírus.....	44
Tabela 4.4. Severidade da doença em crianças positivas para enterovírus.....	46
Tabela 4.5. Isolamento viral de amostras ambientais .....	58
Tabela 4.6. Enterovirus identificados por local de coleta em amostras ambientais .....	59



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% – Porcentagem

µg – Microgramas

µg/mL – Micrograma por microlitro

µL – Microlitro

a.C – Antes de Cristo

aa - Aminoácidos

AlCl<sub>3</sub> – Cloreto de Alumínio

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

cm<sup>2</sup> – Centímetros quadrados

CNBS – Comitê Nacional de Bioética em Saúde

CV – Coxsackievirus

C<sub>T</sub> – Ciclo *threshold*

DMPN – Doença de mão pé e boca

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E – Echovirus

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

EUA – Estado Unidos da América

EV – Enterovírus

g – Gramas

GA – Gastroenterite aguda

HCl – Ácido Clorídrico

HeLa – Célula originária de carcinoma epitelial de cérvix humano

HEp2C – Célula de carcinoma epidermóide de laringe humana

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

INS – Instituto Nacional de Saúde

Kb – Quilobase

Kg – Quilogramas

Km<sup>2</sup> – Quilômetros quadrados

L20B – Células L de camundongo geneticamente modificadas, com receptor humano para poliovírus

mL – Mililitros  
mm – Milímetro  
mM – Milimolar  
MRC-5 – Fibroblastos de pulmão de embrião humano  
N – Nanomolar  
NaOH – Hidróxido de Sódio  
ng – Nanogramas  
nm – Nanômetro  
°C – Graus Celsius  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
pb – Pares de base  
PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase  
PFA – Paralisia Flácida Aguda  
pH – Potencial hidrogeniônico  
ppm – Partes por milhão  
PV – Poliovírus  
qRT-PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real precedida pela transcrição reversa  
RD – Célula de rhabdomiosarcoma embrionário humano  
RDC – República Democrática do Congo  
RNA – Ácido ribonucleico  
RO – Organelas de replicação  
rpm – Rotações por minuto  
RT – Transcrição reversa  
RT-PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase precedida de transcrição reversa  
RV – Rinovírus  
RVH – Rinovírus humanos  
SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
SiO<sub>2</sub> – Dióxido de Sílica  
TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA  
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
U/μL – Unidades por microlitro

UTR – Região não traduzida (*Untranslated region*)

V – Volume

VA – Vigilância ambiental

VDPV – Poliovírus derivado da vacina

ViNaDia – Vigilância Nacional de Diarreias

VPg – Proteína ligada ao genoma

# 1. INTRODUÇÃO

A doença diarreica aguda é caracterizada pela evacuação de fezes aquosas, três ou mais vezes no intervalo de 24 horas, acompanhada ou não de outros sinais e sintomas (1). A infecção pode ser transmitida através de alimentos ou água contaminada ou de pessoa para pessoa como resultado de falta de higiene (1). Em 2017 a fracção atribuível de óbitos por diarreia em crianças menores de cinco anos no mundo foi de 8%, apesar de ter reduzido em cerca de 60%, quando comparado entre 1990 a 2017 (2,3). Contudo, cerca de 1.300 crianças evoluem a óbito por dia, e 480.000 crianças no ano de 2017 (2).

A maioria das mortes por diarreia ocorre em crianças que vivem no sul da Ásia e na África subsaariana (2,3) (Figura 1.1). O número global de óbitos por diarreia continua elevado a nível mundial, apesar da redução verificada nos últimos anos, devido ao tratamento massivo através do uso da terapia de reidratação, sais de reidratação oral, campanhas de educação sanitária, consumo de água potável e acesso a serviços de saúde (4,5).

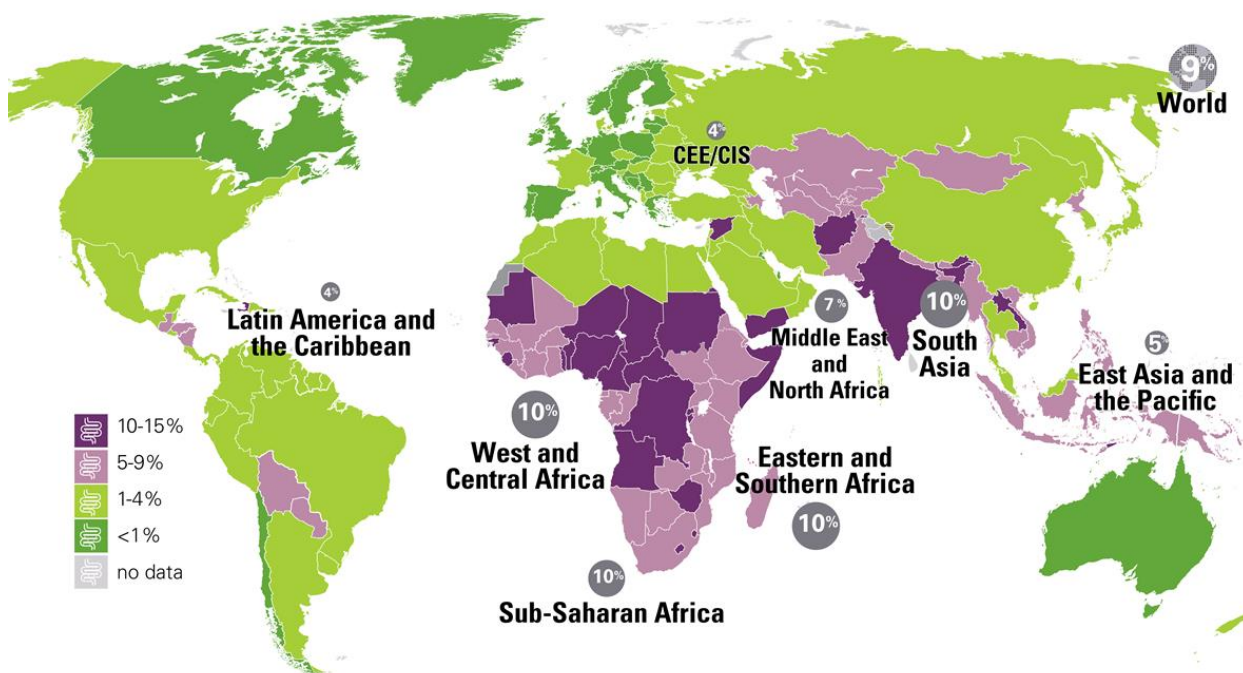


Figura 1.1. Estimativas de óbitos por diarreia no mundo (6).

Nas áreas com elevados índices de infecção nas crianças pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), não obstante a redução de casos, a diarreia permanece

como uma das principais causas de morbidade e mortalidade, principalmente na África Sub Saariana (4,7).

A diarreia leva à desidratação e pode ser fatal, principalmente em crianças pequenas e pessoas desnutridas ou com imunidade comprometida (1). Para aferir a gravidade da diarreia, utiliza-se a escala de Ruuska e Vesikari, que consiste em avaliar o quadro dos sintomas clínicos resultantes da diarreia, através de categorização em níveis de leve a muito grave (8).

Em Moçambique, a diarreia ainda é uma das principais causas de óbitos em crianças. Estima-se que 5.741 crianças com idade inferior a cinco anos morreram por essa infecção, o que corresponde a 7% das causas de óbitos de crianças desta faixa etária em 2018 (2). Uma das principais preocupações do Ministério da Saúde moçambicano é a desnutrição calórico-proteica grave oriunda de episódios subsequentes de diarreia comuns no país (9).

Vários agentes etiológicos têm sido implicados como causa de doenças diarreicas, destacando-se bactérias, protozoários e vírus (1,7,10). Dentre os patógenos virais, os rotavírus, norovírus, astrovírus e adenovírus são responsáveis por cerca de 43.5% dos casos (7,11). No entanto, cerca de 40% da doença diarreica não possui o agente etiológico identificado, e a detecção de alguns tipos de enterovírus (EV) nas fezes de pacientes com quadros de GA indica o possível papel desses vírus na doença diarreica (12–14).

## **1.1 Enterovírus**

### **1.1.1 Histórico dos enterovírus**

O conhecimento existente sobre os enterovírus, na sua maioria, deve-se aos estudos desenvolvidos para compreender o poliovírus, agente viral mais estudado do gênero e que causa a paralisia flácida aguda, também conhecida como poliomielite (15,16). A denominação enterovírus deve-se ao seu tropismo, o trato gastrointestinal, apesar de não serem comumente associados a doenças entéricas (15).

Achados arqueológicos egípcios de uma estela que se estima ser datada do século II a.C mostram evidências de a poliomielite constitui doença antiga (15).

Em 1840, o ortopedista alemão Jacob von Heine diferenciou a poliomielite como uma doença separada (17). Por outro lado, em 1890, o pediatra sueco O. Medin sugeriu a natureza infecciosa desta doença com base em seu padrão de disseminação epidêmica (17).

Um marco importante foi a sua propagação do PV em monocamada de células por Enders e colaboradores (1949), o que não só propiciou o isolamento de enterovírus como também o desenvolvimento da cultura celular moderna, o isolamento de outros agentes virais, o desenvolvimento das vacinas contra a poliomielite atualmente utilizadas e o desenvolvimento da virologia como um todo (15,16).

A conjuntivite hemorrágica espalhou-se a partir do continente Africano e sudoeste Asiático de 1969 a 1973, e o enterovírus 70 foi identificado (18,19). Em epidemias subsequentes uma “variante” antigênica de coxsackievírus A24 foi identificado como o agente etiológico da conjuntivite hemorrágica aguda, doença altamente contagiosa (18,19).

Na década de 1980, o poliovírus tornou-se o primeiro vírus a ser clonado, sequenciado e a ter sua estrutura tridimensional descrita (20,21). Estudos sobre poliovírus auxiliaram o desenvolvimento da biologia molecular, o que, por sua vez, propiciou um grande entendimento de outros EVs (15).

O poliovírus é o enterovírus mais neurovirulento, e esforços para sua eliminação foram uma das histórias de sucesso da virologia do século XX, mercê a criação da rede global de vigilância da poliomielite da OMS, que começou em 1988, resultante da Assembleia Mundial da Saúde para erradicar a poliomielite foi aprovada no mesmo ano (22).

A doença de mão-pé e boca (DMPB) foi originalmente identificada como uma manifestação específica de infecções por enterovírus em 1956 (18). Surtos de (DMPB) causados por enterovirus A71 têm sido relatados com frequência desde 1969 e uma série de epidemias na região Ásia-Pacífico (Austrália, Japão, Malásia, Taiwan, Vietnã e China) entre 1997 e 2010 (18).

O enterovirus D68 foi isolado pela primeira vez em 1962, em crianças com doenças respiratórias e teve circulação limitada nos Estados Unidos por quatro décadas (18). Desde 2004, tem sido relatado em vários países, nomeadamente na Tailândia, Holanda, Nova Zelândia, Quênia e Japão (18). Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa têm associado os EVs das espécies A à C a casos de GA (7,14,23–25).

### **1.1.2 Classificação taxonômica dos enterovírus**

Em 1963, foi criado o termo "Picornavirus" para denominar um conjunto de vírus de características físicas e biofísicas comuns, como pequenos, não envelopados, genoma RNA fita simples, de polaridade positiva, simetria icosaédrica com um diâmetro de cerca de 30-32

nm e resistentes a pH ácido, o que foi utilizado como base para o nome da família, *Picornaviridae* (26).

A classificação taxonômica dos enterovírus atualmente é baseada na análise filogenética de diferentes genomas virais e na região que codifica proteínas estruturais. Os EV pertencem ao Reino *Riboviria*, Ordem *Picornavirales*, Família *Picornaviridae* e Gênero *Enterovirus* (26,27). Atualmente, o gênero compreende 15 espécies (Quadro 1.1): *Enterovirus A* a *L* e *Rhinovirus A* a *C* (26,27). Dentre as espécies que infectam o homem, estão os *Enterovírus A* a *D* (28).

Quadro 1.1 Classificação dos Enterovírus

<b>Espécie (Número de tipos)</b>	<b>Tipos</b>
<i>Enterovírus A</i> (25)	CVA2, CVA3, CVA4, CVA5, CVA6, CVA7, CVA8, CVA10, CVA12, CVA14, CVA16, EV-A71, EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-A92, EV-A114, EV-A119, EV-A120, EV-A121, EV-A122 (anterior SV19), EV-A123 (anterior SV43), EV-A124 (anterior SV46) e EV-125 (anterior BA13).
<i>Enterovírus B</i> (63)	CVB1, CVB2, CVB3, CVB4 (inclui vírus da doença vesicular suína 2 [SVDV-2], CVB5 (inclui SVDV-1), CVB6, CVA9, echovirus 1 (E1; inclui E8), E2, E3, E4, E5, E6, E7, E9 (inclui CVA23), E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E24, E25, E26, E27, E29, E30, E31, E32, E33, enterovírus B69 (EV-B69), EV-B73, EV-B74, EV-B75, EV-B77, EV-B78, EV-B79, EV-B80, EV-B81, EV-B82, EV-B83, EV-B84, EV-B85, EV-B86, EV-B87, EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107, EV-B110 (de chimpanzé), EV-B111, EV-B112 (Chimpanzé), EV-B113 (Babuíno) e EV-B114 [anteriormente chamado agente símio 5 (SA5)].
<i>Enterovírus C</i> (23)	PV1, PV2, PV3, CVA1, CVA11, CVA13, CVA17, CVA19, CVA20, CVA21, CVA22, CVA24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117 e EV-C118.
<i>Enterovírus D</i> (5)	EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111 (Humanos e Chimpanzés) e EV-D120 (Gorilas).
<i>Enterovirus E</i> (4)	EV-E1, EV-E2, EV-E3 e EV-E4.
<i>Enterovirus F</i> (6)	EV-F1, EV-F2, EV-F3, EV-F4, EV-F5 e EV-F6.
<i>Enterovirus G</i> (20)	EV-G1, EV-G2, EV-G3, EV-G4, EV-G5, EV-G6, EV-G7, EV-G8, EV-G9, EV-G10, EV-G11, EV-G12, EV-G13, EV-G14, EV-G15, EV-G16, EV-G17, EV-G18, EV-G19 e EV-G20.

<i>Enterovirus H</i> (1)	EV-H1
<i>Enterovirus I</i> (1)	Enterovirus I
<i>Enterovirus J</i> (6)	EV-J103, EV-J108, EV-J112, EV-J115, EV-J121 e EV-J122.
<i>Enterovirus K</i> (2)	EV-K1 e EV-K2.
<i>Enterovirus L</i> (1)	EV-L1
<i>Rhinovirus A</i> (80)	RV A1, A2, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A15, A16, A18, A19, A20, A21, A22, A23, A24, A25, A28, A29, A30, A31, A32, A33, A34, A36, A38, A39, A40, A41, A43, A45, A46, A47, A49, A50, A51, A53, A54, A55, A56, A57, A58, A59, A60, A61, A62, A63, A64, A65, A66, A67, A68, A71, A73, A74, A75, A76, A77, A78, A80, A81, A82, A85, A88, A89, A90, A94, A96, A100, A101, A102, A103, A104, A105, A106, A107, A108 e A109.
<i>Rhinovirus B</i> (32)	RV B3, B4, B5, B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91, B92, B93, B97, B99, B100, B101, B102, B103, B104, B105 e B106.
<i>Rhinovirus C</i> (57)	RV-C1 a RV-C57

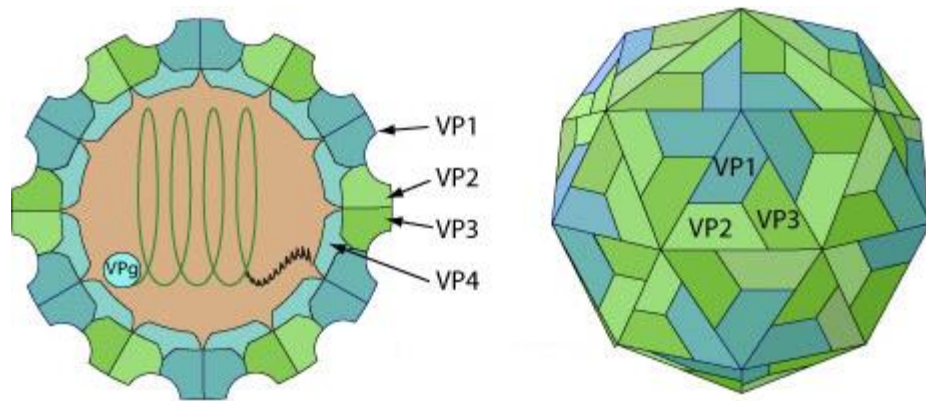
Legenda: CVA – coxsackievirus A; CVB – coxsackievirus B; E – echovirus; EV - enterovírus; PV – poliovírus. Fonte: Adaptado de [www.picornaviridae.com](http://www.picornaviridae.com) (27,28).

### 1.1.3 Estrutura dos enterovírus

Os enterovírus possuem simetria icosaédrica, o vírus tem 30nm de diâmetro e seu capsídeo é composto por 60 protômeros, cada um compreendendo os quatro proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4, sendo as três primeiras estão localizadas na parte externa do capsídeo (Figura 1.2) (29). Por outro lado a VP4 está localizada no lado interno do capsídeo e ligada ao RNA genômico (29).

A VP1 é a mais exposta, e é nela em que se encontram os principais sítios antigênicos utilizados no reconhecimento dos receptores celulares, assim como sua sequência gênica que é utilizada para a identificação dos diversos tipos dos enterovírus (29,30).





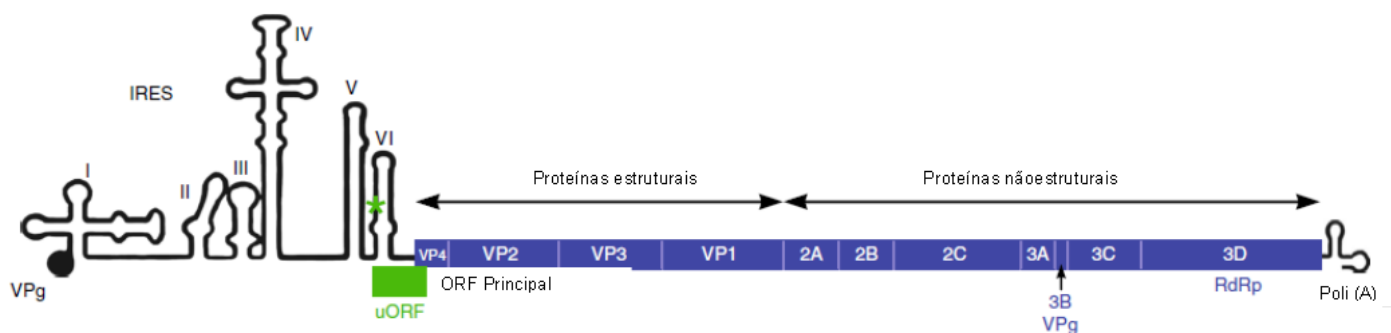
**Figura 1.2. Esquema ilustrativo dos enterovírus.** O vírus apresenta simetria icosaédrica e seu material genético é composto por uma fita de RNA, que se encontra dentro do capsídeo e covalentemente ligada a VP4. As proteínas VP1, VP2 e VP3 compõem a parte externa do capsídeo viral (29).

O genoma viral é constituído por uma fita de RNA de polaridade positiva, de aproximadamente 7,2 a 8,4 kb de comprimento e peso molecular de  $2,6 \times 10^6$  Daltons (26). O genoma do vírus contém um único quadro de leitura aberto (ORF), que é traduzido como uma grande poliproteína que é clivada para produzir o capsídeo viral (VP1 a VP4) e proteínas não estruturais (Figura 1.3) (31).

A extremidade do genoma 3' é poliadenilada e contém sinais que estão envolvidos na replicação e circularização do genoma (31). Na extremidade 5' está ligada covalentemente a uma proteína viral VPg e a região não traduzida 5' (UTR) na qual abriga um local interno de entrada de ribossomo (IRES) que medeia a tradução (31).

O IRES dos enterovírus compreende vários domínios de RNAs estruturados denominados de II a VI (Figura 1.3), o domínio VI (dVI) compreende um *loop*-tronco contendo um códon AUG altamente conservado, que é seguido por um ORF de 65 *códons* a montante (uORF) denominado Proteína U (31).

Esta proteína possui um papel importante no durante o estabelecimento de infecção produtiva por enterovírus das espécies *Enterovirus A*, *B* e *C*, no epitélio intestinal nos estágios iniciais da invasão viral de hospedeiros suscetíveis (31).



**Figura 1.3. Genoma dos enterovírus.** A VPg encontra-se ligada na extremidade 5', a côm verde está localizada a proteína U, seguida da poliproteína com proteínas estruturais e não estruturais e a cauda Poli (A) na extremidade 3' (31).

### 1.1.4 Propriedades físico-químicas dos enterovírus

Os enterovírus são estáveis em pH de 3 a 9 e baixas temperaturas (-20 a -80°C) por muitos anos (32). Esses vírus são resistentes a alguns desinfetantes de uso rotineiro, como álcool a 70%, isopropanol, clorofórmio e éter (32,33). Entretanto, são inativados pela ação da luz ultravioleta, uso de formaldeído a 0.3%, cloro residual livre (0,3 a 0,5 ppm), ácido clorídrico (0,1 N), glutaraldeído a 2% e calor (50°C/60 minutos) (33,34).

### 1.1.5 Ciclo replicativo dos enterovírus

Um determinante importante do tropismo viral é a expressão do(s) receptor(es) específico(s) do vírus na superfície celular (19). Desde que o CD155 foi identificado como o receptor do poliovírus, outros receptores para diversos enterovírus foram descobertos, evidenciando que os EV podem infectar ampla variedade de células e tecidos (19).

A biossíntese dos enterovírus ocorre no citoplasma da célula hospedeira (Figura 1.4). O processo se inicia com a ligação do vírus a um ou vários receptores na superfície celular, seguido de endocitose mediada por receptor ou fatores de ligação (19,30).

As alterações de pH e/ou ligação ao receptor no endossoma induzem ao desnudamento, devido a degradação das partículas virais e o recrutamento da fosfolipase PLA2G16, que permite a liberação do genoma viral no citoplasma (19,30).

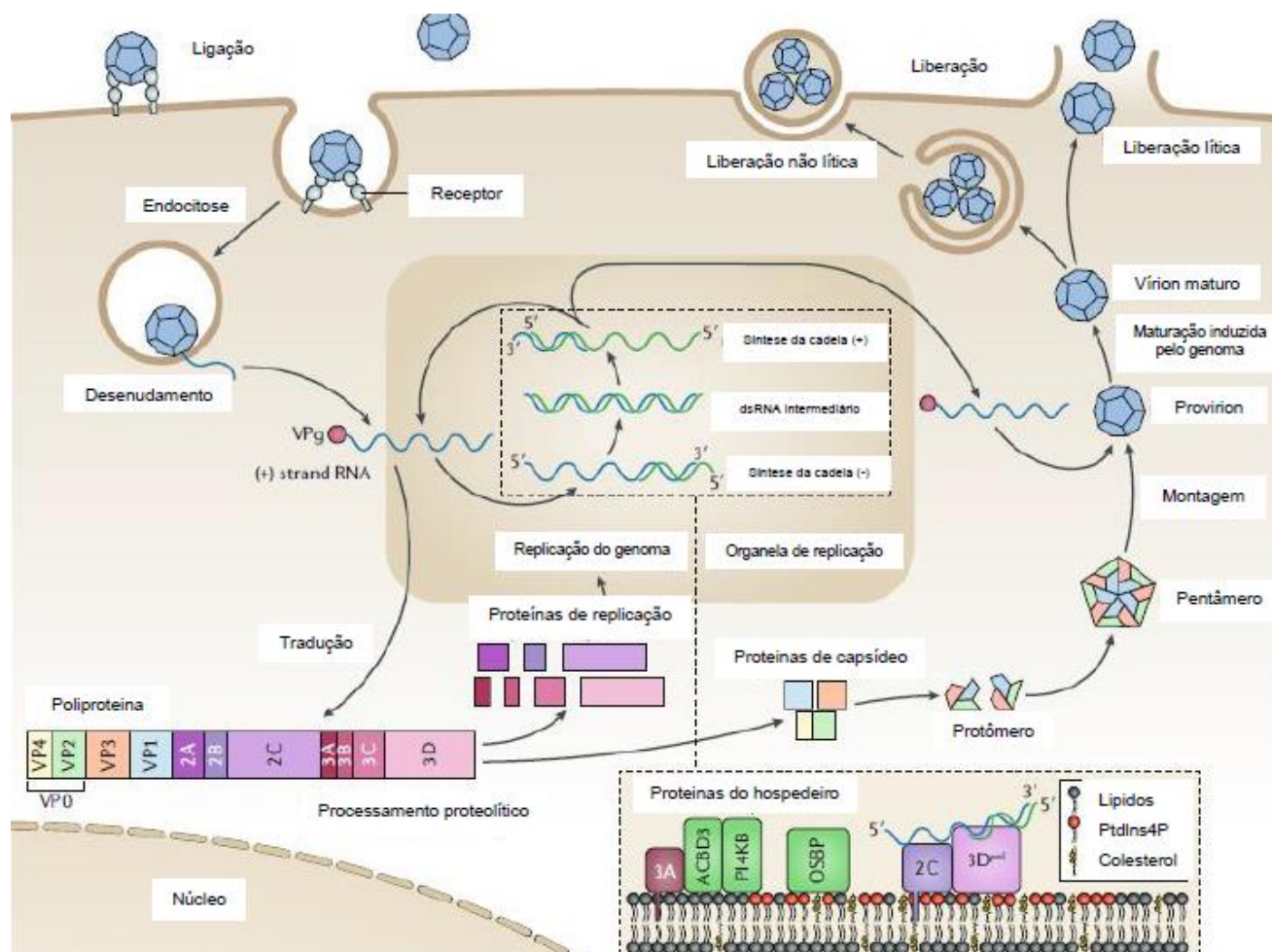
Uma vez no citoplasma da célula, o RNA viral é traduzido em uma poliproteína, que é clivada proteoliticamente e origina as proteínas associadas à replicação (2A – 2C e 3A – 3D) e proteínas do capsídeo (VP0, VP1 e VP3) (30,31).

A replicação do genoma ocorre em estruturas de membrana induzidas por vírus denominadas organelas de replicação (RO) (19,35). A RNA polimerase RNA dependente (3D) inicia a síntese de uma fita de polaridade negativa, que serve para gerar um intermediário de replicação de RNA de fita dupla (30). A partir desse intermediário são sintetizadas as fitas de RNA positivo; os RNAs virais recém-sintetizados servem de molde para posterior tradução e replicação ou são encapsidados em novos *virions* (30).

As proteínas do capsídeo se auto-organizam em protômeros e pentâmeros e, em conjunto com o mecanismo de replicação e o RNA genômico, se agrupam em *provirions* que são convertidas em *virions* infecciosos e maduros mediante a clivagem do VP0 em VP4 e VP2 (19,30).

Embora os enterovírus sejam descritos como vírus líticos, há evidências de que os EV também podem sair antes da lise celular em estruturas ligadas à membrana que podem acomodar múltiplos *virions* (31,36).

O ciclo de replicação viral desde a entrada e a saída do vírus na célula infetada pode variar de cinco a dez horas. Este período pode ser afetado pelo pH, temperatura, tipo viral e as defesas do hospedeiro (37,38).



**Figura 1.4. Esquema ilustrativo do ciclo replicativo dos enterovírus.** Principais etapas da biossíntese viral, adsorção à liberação das partículas virais, modificado de Baggen e colaboradores em 2018 (30).

### 1.1.6 Propriedades antigênicas dos enterovírus

As três proteínas estruturais que constituem a face mais externa do capsídeo (VP1, VP2 e VP3) contêm epítomos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes (32).

A evolução dos picornavírus resultou em um número muito grande de membros facilmente distinguíveis (22). Essa variabilidade foi categorizada antígenicamente como tipo. Cada um dos tipos se correlaciona com a resposta imunológica do hospedeiro humano, proteção contra doenças, uso de receptores e o espectro da doença clínica (32).

A distinção entre diferentes tipos utilizando anticorpos torna-se complicada no âmbito das espécies (32). Contudo, apesar dessas limitações, o tipo continua sendo a propriedade física mais importante que distingue os diferentes enterovírus (22,32).

As infecções pelos enterovírus levam ao desenvolvimento de uma resposta imunológica, tipo específica e duradoura (16). A resposta humoral é importante e pode ser observada em indivíduos hipogamaglobulinêmicos, onde as doenças ocorrem com maior gravidade, principalmente em recém-nascidos (16).

### **1.1.7 Patogenia da infecção pelos Enterovírus**

Os enterovírus causam um amplo espectro de doenças, incluindo doenças neurológicas e respiratórias graves (30). As vias de transmissão são fecal-oral, inalação, contato pessoa à pessoa ou contato com secreções oculares (38).

Após a infecção o período de incubação varia de 12 horas a 35 dias, dependendo de vários fatores como tipo viral, doença clínica e a imunidade do hospedeiro (16).

A replicação viral se inicia logo após a entrada do vírus, provavelmente no tecido linfóide da laringe (orofaríngea) e nas placas de Peyer no intestino (38). Em alguns casos, ocorre uma curta viremia, fazendo com que os vírus atinjam órgãos alvo específicos (medula espinhal, pele, miocárdio, meninges e cérebro) e células do sistema retículo endotelial (Figura 1.5) (38).

A infecção por enterovírus em alguns sítios, como amígdalas, linfonodos da orofaringe e dos intestinos, pode fazer com que ocorra uma disseminação sistêmica, com viremia transitória, podendo culminar com espalhamento da infecção em órgãos secundários como o Sistema nervoso (periférico e central) e o coração (Figura 1.5) (15).

Indivíduos assintomáticos ou sintomáticos excretam vírus pelas fezes, por um período que varia de duas a oito semanas após a infecção e pela faringe, a excreção se dá em uma a duas semanas, através da saliva (16,38).



**Figura 1.5. Patogênese da infecção por enterovírus.** O quadro se inicia com a replicação viral na orofaringe ou placas de Peyer, seguido por viremia primária. O vírus propaga pelo sistema circulatório ou linfático até órgãos-alvos, o vírus replica e pode ocorrer viremia secundária. Figura criada pelo autor da tese.

### 1.1.8 Epidemiologia das infecções por enterovírus

Os enterovírus possuem distribuição global e sua transmissão depende de vários fatores, incluindo saneamento básico, padrões de higiene, aglomeração populacional, localização geográfica, estação do ano e características do hospedeiro, especialmente a idade (39,40).

O homem é um dos principais reservatórios naturais dos enterovírus e a principal fonte de disseminação viral (28). Diferentes vias de transmissão são observadas e variam de acordo com o tipo viral, o quadro de doença associado, estado imune e condições sanitárias (19).

A transmissão pelas vias respiratórias ocorre através de gotículas de secreções orofaríngeas eliminadas por indivíduos infectados e desempenha um papel importante nos países desenvolvidos (15,16). Existem outras formas de transmissão como o contato com secreções oculares (38).

O vírus pode ser encontrado nas secreções da orofaringe, fezes ou secreções oculares antes do aparecimento dos sintomas (15,16).

A via fecal-oral é predominante em regiões com condições precárias de higiene e saneamento, onde há consumo de água ou alimentos contaminados e um grande número de indivíduos na mesma habitação, o que facilita a transmissão (15,16). Uma vez excretados no ambiente os enterovírus são também detectados em águas do esgoto, piscinas, rios, lagos, solo (22).

Diferentes fatores têm efeitos sobre a infecção por enterovírus, dentre eles a idade, sexo e perfil socioeconômico (15). A idade é um determinante importante da susceptibilidade, manifestação clínica, gravidade e resultado da infecção (16,38). As crianças são o principal alvo e transmissores mais importantes dos EV (15). No entanto, crianças maiores de cinco anos, adolescentes e adultos geralmente desenvolvem doenças mais graves quando infectadas, e os recém-nascidos são importantes pela excreção viral prolongada (15).

No que diz respeito ao sexo, uma maior proporção de casos é observada em homens, isto pode estar associado a várias razões, incluindo fatores biológicos, comportamentais e sociológicos (15,41,42). Contudo, exceções são observadas, onde a maior proporção é observada no sexo feminino (43–45).

As infecções por enterovírus são mais frequentes em locais com condições sanitárias precárias e socioeconômicas baixas, quando comparadas as áreas urbanas com melhores condições (15,16,46).

A distribuição dos EV varia de acordo com a área geográfica e as condições climáticas (15,39). Contudo, diferentes prevalências em regiões do mesmo país são observadas (15,47).

Em regiões de clima temperado, as infecções por enterovírus apresentam sazonalidade definida, sendo mais frequentes durante o verão e início do outono (15,16). Nas áreas com clima tropical e semitropical, os vírus circulam durante todo o ano, ou apresentam-se com mais frequência na época chuvosa (16,48).

### **1.1.9 Manifestações clínicas**

As doenças relacionadas aos enterovírus incluem poliomielite, síndrome pós-pólio, meningite e encefalite, miocardite, pleurodinia, pericardite, diabetes, conjuntivite, infecção

respiratória, herpangina, doença das mãos, pés e boca e diarreia. A seguir, algumas destas serão descritas de forma sucinta (15,16,38).

**Paralisia Flácida Aguda (PFA):** caracterizada por súbita fraqueza ou perda de tônus muscular que pode ser causada pelos poliovírus (PV1, 2 e 3). Tem curso assintomático em cerca de 90 a 95% dos casos. Nas infecções abortivas, é caracterizada por doença febril, cefaleia, náusea e vômito, entre outros sintomas, mas os pacientes melhoram em poucos dias (30,38).

Os PV podem levar ao desenvolvimento de meningite asséptica (15,38). A poliomielite paralítica ocorre em 1% dos casos. A paralisia aparece em média dois a cinco dias após os sintomas e 10 a 15% destes indivíduos podem desenvolver a poliomielite bulbar, que compromete a respiração e o sistema vasomotor (15,16).

Moçambique registou nos últimos anos a circulação de dois isolados de poliovírus tipo 2 derivados de vacinas circulantes geneticamente ligadas (cVDPV2), que foram relatados no distrito de Molumbo, província de Zambézia, Moçambique (49).

**Paralisia causada por enterovírus não pólio:** o quadro é similar à poliomielite, que inicia com febre no período de um a três dias e começo da paralisia flácida por mais uns dois dias. Raramente, ocorre o envolvimento bulbar e a manifestação clínica é mais suave que a da pólio, uma vez que a maior parte dos pacientes se recupera completamente. O enterovírus mais associado a esses surtos de paralisia são os EV-71 (16,50).

**Síndrome pós-pólio:** Esta síndrome afeta 20-40% dos indivíduos acometidos pela poliomielite e se manifesta como complicações neuromusculares (51). A incidência, sintomas e gravidade da síndrome variam e alguns pacientes são conhecidos por desenvolver fraqueza, atrofia, fadiga, dores musculares e articulares e outras complicações (51,52).

**Meningite e encefalite:** a meningite é geralmente autolimitada e caracterizada por febre e mal estar, que evolui para irritação das meninges e rigidez da nuca ou costas em poucos dias, sendo na maioria dos casos causada por E30, E6, CVA2, CVA9, CVB4 e CVB5 (19,53). A encefalite é caracterizada pela infecção no sistema nervoso central, que resulta em inflamação aguda do cérebro (54). Os vírus mais implicados são EV-71, CVA2, CVA9, CVB4 e CVB5 (19,50,54).

**Miocardite:** tem como característica fundamental a inflamação da membrana que reveste o coração, podendo progredir para cardiomiopatia dilatada (30,50). Os CVB3 são mais implicados, principalmente em crianças (55).



**Pleurodinia:** caracterizada por uma súbita dor nos músculos entre as costelas (30). A manifestação mais frequente é o quadro febril agudo e mialgia. Os enterovírus mais comuns são CV B3 a B6 (15,56).

**Conjuntivite:** é caracterizada por um curto período de incubação e sintomas como lacrimação excessiva, dor, inchaço e vermelhidão da conjuntiva. EV-70 e CV A24v causam a forma hemorrágica, enquanto CVA9, A10, A16 e B5 e E1, E4, E6, E7, E9, E16 e E20 estão associados à conjuntivite não hemorrágica (19).

**Herpangina:** é caracterizada pela presença de lesões papilares, vesiculares e ulcerativas nas amígdalas, dor de garganta, dor de cabeça, dores musculares, entre outros sintomas. Ocorre preferencialmente em crianças, é benigna e os enterovírus mais envolvidos são CVA6, CVA10, CVA16 e EV-71 (38,57,58).

**Infecção respiratória:** é comum e caracteriza-se por infecção nos tratos superior e inferior. O tipo viral mais relatado é o EV-D68. Entretanto, outros tipos têm sido implicados, como CV A e B e echovirus (15,38,59).

**Doença de pé, mão e boca:** doença exantemática que tem como peculiaridade a apresentação de lesões vesiculares nas mãos, pés e boca, em alguns casos, nas nádegas (58). É uma doença comum em crianças, com curso autolimitado e relatos de surtos, os enterovírus mais envolvidos são E6 e EV-71 (16,38).

**Doença diarreica:** os enterovírus têm sido identificados em casos esporádicos de diarreia em alguns estudos (11,13,23,24). Apesar da associação com diarreia ainda não estar bem documentada, pesquisas realizadas por vários grupos de trabalhos têm destacado o papel de diversos enterovírus como agentes etiológicos da gastroenterite, com ênfase para coxsackievirus e echovirus (CVA5, CVA10, CVA11, CVA24, CVB3, CVB5, E14, E20, EV-C99) (13,14,23,60,61).

#### **1.1.10 Vigilância ambiental**

A pesquisa de vírus entéricos humanos em amostras ambientais iniciou-se na década de 1940 e a vigilância ambiental (VA) utiliza o monitoramento da circulação de vírus entéricos para avaliar a extensão ou duração dos surtos em populações (62–64).

Os esgotos podem conter vírus entéricos que são excretados de indivíduos, independentemente de apresentar sintomas ou não. Assim, o rastreamento da contaminação

viral nessas amostras pode refletir o estado da circulação viral numa determinada região (65,66).

A VA é extremamente importante como parte dos esforços globais da Iniciativa de Erradicação da Poliomielite (PEI) desde os progressos da resolução da Assembleia Mundial da Saúde (1988) para erradicar a poliomielite (22).

Em alguns países onde existe a vigilância da Paralisia Flácida Aguda (PFA) como forma de demonstração da ausência da pólio há dificuldade em manter a qualidade da vigilância no nível exigido pelo PEI (22). Esses países geralmente possuem sistemas de vigilância ambiental além da vigilância da PFA para a detecção e investigação de possíveis infecções por poliovírus (22).

A VA é alternativa ou suplementar a vigilância de PFA (22). As diretrizes para o estabelecimento e manutenção da vigilância ambiental em apoio à PEI foram estabelecidas pela OMS (63).

A vigilância ambiental tem demonstrado ser uma abordagem muito eficaz na investigação em países com um sistema limitado de vigilância epidemiológica (67,68). Por outro lado, as informações obtidas na VA são de grande importância para a saúde pública (67,68).

Estudos de vigilância ambiental demonstram a presença de diferentes enterovírus em amostras de esgoto (69–71). Esses patógenos são relativamente resistentes a fatores ambientais, como temperatura e pH, por um período de tempo longo (22,63).

Deste modo, o monitoramento dos enterovírus nas águas do esgoto fornece informações valiosas sobre a circulação destes vírus na população, especialmente na ausência de casos sintomáticos (22,68,72).

### **1.11 Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico padrão das infecções causadas pelos enterovírus em amostras clínicas ou ambientais é baseado no isolamento viral em cultivo celular utilizando as linhagens susceptíveis que permitem a replicação destes vírus (22,63,73). A identificação molecular depende principalmente do sequenciamento nucleotídico do gene que codifica proteínas do capsídeo viral (22).

A pesquisa de enterovírus pode ser feita em diversos tipos de amostras e a escolha depende da suspeita clínica. Os espécimes clínicos mais comumente utilizados são fezes,

*swab* retal, urina, lavado ou *swab* de garganta, líquido cefalorraquidiano, fluidos vesiculares, zaragatoa de conjuntiva e secreções nasais (63,73).

As linhagens celulares frequentemente usadas para o isolamento dos enterovírus podem ser primárias ou linhagem contínua sendo permissíveis para diferentes tipos de vírus, dentre elas a célula de rhabdomiosarcoma embrionário humano (RD), célula de carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp2C), célula originária de carcinoma epitelial de cérvix humano (HeLa), célula de rim de macaco-verde africano, *Cercopithecus aethiops* (Vero), fibroblastos de pulmão de embrião humano (MRC-5), Rim canino de Madin Darby (MDCK), rim embrionário humano (HEK), Fibroblasto embrionário humano (HEF) e células L de camundongo geneticamente modificadas, com receptor humano para poliovírus (L20B) (22,73). O vírus na célula susceptível causa efeito citopático caracterizado por arredondamento, enrugamento, picnose nuclear, degeneração e descolamento da monocamada do suporte (38).

Os isolados são identificados por métodos sorológicos ou moleculares (22,73). Entre os testes sorológicos, destacam-se a imunofluorescência, neutralização, inibição da hemaglutinação, fixação do complemento e imunoenzimático (22,73).

Por sua vez, é possível uma identificação direta do vírus a partir da amostra clínica ou ambiental, através dos testes moleculares que se baseiam na reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) ou reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real precedida de transcrição reversa (RT-qPCR) (22,74).

A caracterização molecular depende principalmente do sequenciamento nucleotídico do capsídeo viral, sendo a região que codifica para a VP1 a mais amplamente utilizada (22,73). No caso particular do poliovírus o sequenciamento nucleotídeo é uma ferramenta muito importante, pois permite, dentre outras coisas, a diferenciação entre os isolados dos vírus selvagem e vacinal (73).

## **1.12 Prevenção, controle e tratamento**

Atualmente, estão disponíveis duas vacinas para prevenção da poliomielite, uma de vírus atenuado (administrada por via oral, com liberação do vírus no ambiente, leva a imunização de rebanho, com o risco de reversão da atenuação em pólio pós-vacinal) e a outra inativada (aplicada por via intramuscular, ideal para regiões com condições adequadas

de saneamento (75). Apresenta menor risco de reversão, mas não induz à imunidade rebanho, e essas vacinas são utilizadas em nível global (75).

Ainda não há vacinas disponíveis para os enterovírus não pólio, apesar de existirem alguns estudos em desenvolvimento, como da cepa de vírus atenuado EV-A71 e CVA16 (18,76).

O controle de doenças associadas à enterovírus, especialmente os EV não pólio pode ser realizada através de medidas básicas de higiene e saneamento básico (15,38).

A maior parte dos indivíduos infectados com enterovírus não apresenta sintomas, mas pode disseminar o vírus para outras pessoas, o que dificulta a adoção de medidas de controle. Neste contexto, as medidas de controle são as mesmas medidas de prevenção (40). A vigilância epidemiológica e ambiental são importantes no contexto de prevenção e controle de infecções por enterovírus (22).

Não existe ainda tratamento específico, a pessoa com manifestação clínica leve é tratada para os sinais e sintomas da doença (40). A maioria dos acometidos recupera-se alguns dias depois (40). No entanto, a evolução clínica pode demandar de hospitalização (75). Finalmente estudos para o desenvolvimento de antivirais encontram-se em curso, estes atuam baseados nas fases do ciclo replicativo viral (77).

### **1.13 Descrição da saúde da criança moçambicana**

A expansão e a disponibilidade dos serviços de saúde, a pesar da prontidão destes serviços ainda é um desafio em Moçambique, necessitando de melhorias estruturais e sistêmicas (78).

A situação de saúde será descrita de forma resumida e segundo os achados do último Inquérito de Indicadores de Imunização, Malária e HIV/SIDA de Moçambique, conduzido em 2015 (9). De uma maneira geral, os dados apontaram para uma melhoria no estado de saúde das crianças moçambicanas.

O número de crianças em que foram administradas todas as vacinas previstas no calendário vacinal aumentou significativamente de 47% em 1997 para 63% em 2003. Um aumento de 5% foi observado no período de 2003 e 2015 (9).

O percentual de crianças nas quais não foi administrada qualquer vacina reduziu de 20% em 1997 para 5% em 2015. O nível de cobertura vacinal está diretamente ligado ao nível de escolaridade das mães, sendo 53% para as que não possuem instrução e 85% com nível secundário ou superior (9).

A incidência das infecções respiratórias agudas mostrou uma diminuição no período de 2003 a 2011, e um incremento no período de 2011 a 2015 (9). Consequentemente, a procura de tratamento foi menor entre 2003 a 2011 e no período de 2011 a 2015 apresentou um leve aumento (9).

Os casos de anemia reduziram de 69% para 64% de 2011 a 2015, respectivamente(9), maior prevalência (74%) é observada em crianças na faixa etária dos 12-17 meses e em crianças cujas mães apresentam baixas condições socioeconômicas (9).

Crianças residentes nas áreas rurais são atendidas com menos frequência (53%) nos hospitais, em comparação àquelas residentes no meio urbano (64%) e a procura pelos serviços aumenta quanto maior for o nível de escolaridade das mães ou cuidadoras (41 e 70% nos meios rural e urbano, respetivamente) (9).

A diarreia seguida da desidratação constitui uma importante causa de mortalidade infantil no país (9). A doença diarreica tem prevalência elevada na faixa etária dos 12-23 meses (19.1%) e mais baixa entre 48-59 meses (5.6%) (9). O programa alargado de vacinação (PAV) em Moçambique introduziu à vacinação contra rotavírus em Setembro de 2015 (79).

### 1.14 Vigilância Nacional de Diarreias em Moçambique

A Vigilância Nacional de Diarreias (ViNaDia) é uma plataforma que foi implementada em 2014 em Unidades Sanitárias de quatro províncias de Moçambique, nomeadamente: Maputo (capital do país), Nampula, Sofala e Zambézia que atendam 58,3% da população moçambicana (79–81).

A vigilância tem como objetivo principal determinar a frequência de diarreias em crianças dos zero aos 14 anos de idade, os agentes etiológicos associados às mesmas e comparar a proporção dos agentes entre crianças HIV positivas e negativas.

As amostras na ViNaDia são rotineiramente testadas para o rotavírus como principal agente etiológico e para outros patógenos virais, parasitas e bactérias. Para pesquisa de vírus, utiliza-se kit comercial de ELISA (IDEIA™, *Prospect Diagnostics*, Reino Unido), de acordo com as recomendações do fabricante, para: rotavírus (as amostras positivas são genotipadas por RT-PCR), adenovírus, astrovírus e norovírus.

A pesquisa de parasitos nas amostras fecais é realizada por diferentes técnicas. Para a detecção de *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium spp* utiliza-se o kit ELISA (TechLab, Inc, Blacksburg, VA, USA). A técnica de Ziehl-Neelsen modificado é utilizada para detecção de *Cryptosporidium*, *Isospora belli* e *Cyclospora cayetanensis* (82). A técnica de formol-éter é utilizada para detecção de *Ascaris lumbricoides*, *Chilomastix mesnili*, *Endolimax nana*, *Isospora butchilii*, *Blastocystis hominis*, *Trichuris trichiura*, *Balantidium coli*, *Isospora belli*, *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma duodenalis* e *Entamoeba coli* (82).

Bactérias entéricas como *Escherichia coli enteropatogénica*, *Shigella spp*, *Salmonella spp* e *Vibrio cholera* são detectadas por inoculação em meios de cultura para isolamento.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A GA é um problema significativo no mundo, especialmente entre crianças em regiões com poucos recursos e em países em desenvolvimento (11).

Apesar da descrição de uma série de patógenos associados a quadros de GA, uma proporção significativa (30 a 40%) destes não possui agente etiológico conhecido (12).

Nas últimas duas décadas, os enterovírus vêm sendo cada vez mais associados às infecções diarreicas e são frequentemente pesquisados em crianças com quadros de GA (11,13,14,23,83). Vários tipos de enterovírus são diagnosticados, entretanto, ainda há lacunas importantes envolvendo a epidemiologia molecular associada às características sócias demográficas, clínicas e a fatores climáticos são muito limitados (23,25).

A situação da doença diarreica em Moçambique não difere da verificada na maioria dos países da África subsaariana, onde a enfermidade é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade (79,84–86).

No país, não há vigilância de EV nas amostras clínicas de quadros diarreicos e apenas relatos sobre a detecção de vírus entéricos em amostras fecais foram publicados, sendo a maioria focada na detecção de Adenovírus e RV, este último cuja vacina foi introduzida no país em Setembro de 2015 (79,87). Apenas um trabalho sobre a circulação dos enterovírus foi previamente conduzido em Moçambique, na Cidade de Maputo, e incluía amostras fecais de crianças com várias sintomatologias clínicas em 2015. Este estudo demonstrou a circulação de enterovírus nas crianças, incluindo em dois casos de GA (42)

Uma vez infectadas as pessoas podem excretar o vírus através das fezes para o ambiente e a detecção de enterovírus em amostras de esgoto é uma ferramenta muito importante, uma vez que possibilita o monitoramento de vírus que infectam indivíduos e não são relatados nas amostras clínicas e que o país tem reportado surtos relacionados ao poliovírus derivado da vacina (cVDPV) nos últimos anos, o que apoia os esforços globais da OMS para a erradicação da poliomielite (22,49). Apesar da importância, ainda não há vigilância ambiental de enterovirus em Moçambique.

Assim, o presente estudo visa detectar e caracterizar os enterovírus em amostras fecais de casos de GA referenciadas para Vigilância Nacional de Diarreia a partir de estudo transversal de base hospitalar, e ainda sob perspectiva complementar realizar pela primeira vez vigilância ambiental de enterovirus na cidade de Maputo, capital de Moçambique.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

Deteção e caracterização de enterovírus em crianças internadas com diarreia aguda e em amostras ambientais de Moçambique entre os anos de 2014 e 2018.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Detectar e estimar a frequência de enterovírus em amostras fecais de crianças com diarreia aguda nas províncias de Maputo, Sofala, Nampula e Zambézia entre os anos de 2014 e 2018;
2. Descrever as características sociodemográficas e clínicas em relação à positividade para enterovírus;
3. Avaliar e classificar o quadro da diarreia causada pelos enterovírus usando escala de Ruuska e Vesikari;
4. Avaliar a distribuição temporal dos enterovírus em relação aos fatores ambientais umidade relativa, precipitação e temperatura;
5. Realizar a análise filogenética dos enterovírus isolados nas amostras fecais;
6. Detectar e estimar a frequência de enterovírus em amostras de esgoto bruto da cidade de Maputo no ano de 2018; e
7. Realizar a análise filogenética dos enterovírus isolados nas amostras ambientais e clínicas.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudo

Moçambique está localizado na região subsaariana do continente africano. O país possui uma superfície continental de 786.380 km<sup>2</sup> e uma população estimada de 27.909.798 habitantes (80,88). O país corresponde a cerca de 2,6% da superfície do continente, e faz fronteira ao norte com a Tanzânia, a noroeste com o Malawi e a sudoeste com Zimbabwe, África do Sul e Suazilândia. Moçambique é banhado a leste pelo Oceano Índico em toda a extensão da sua costa de 120.000 km<sup>2</sup> (Figura 3.1) (88).



**Figura 3.1. Mapa da África.** Continente Africano, com destaque para Moçambique em vermelho (89).

O país está dividido em 11 províncias. No Norte, encontram-se as províncias do Niassa, Cabo Delgado e Nampula, no Centro estão Tete, Manica, Zambézia e Sofala e no Sul estão Inhambane, Gaza e Maputo, capital do país (88).

Moçambique apresenta um clima tropical, com duas estações bem demarcadas: estação chuvosa (outubro a março) e estação seca (abril a setembro) (88). As condições climáticas em Moçambique variam ao longo do ano, nas três regiões do país, influenciadas pelas monções de nordeste que chegam do Oceano Índico e pelas correntes quentes provenientes do canal de Moçambique (88).

Os indicadores demográficos indicam que 63% dos agregados familiares possuem acesso a água potável, sendo que maior prevalência encontram-se nas áreas urbanas e apenas 20 % da população moçambicana tem acesso a instalações de saneamento básico melhorado (9).

## **3.2. Estudo com amostras clínicas**

### **3.2.1. Aspectos éticos**

O estudo teve aprovação pelo Comitê Nacional de Bioética para a Saúde de Moçambique (154/CNBS/17 [Anexo A] e 348/CNBS/13 [Anexo B]). Foram incluídas crianças menores de cinco anos de idade, atendidas e internadas com quadro de doença diarreica nos Serviços de Pediatria de seis hospitais do país. Os seus responsáveis legais consentiram de forma voluntária para fazerem parte da ViNaDia, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexo C).

### **3.2.2. Tipo de estudo e Amostragem**

Foi conduzido um estudo descritivo transversal, de base hospitalar, nos Serviços de Pediatria nas seis maiores unidades hospitalares do país e que fazem parte da ViNaDia (79).

Entre junho de 2014 e março de 2018 (início em 2014 em Maputo e 2015 ademais províncias), amostras de fezes foram obtidas em unidades hospitalares localizadas em quatro províncias e abrangendo as três regiões de Moçambique (Figura 3.2): centro (Hospital Central da Beira em Sofala e Hospital Provincial de Quelimane na Zambézia), norte (Hospital Central de Nampula em Nampula) e sul (Hospitais Gerais José Macamo e Mavalane e Hospital Central de Maputo em Maputo) (Figura 3.2).

Uma vez coletadas, as amostras foram armazenadas em reservatório plástico impermeável, com a etiqueta identificadora do participante, em geladeira ou caixa térmica a 4°C e, em seguida, enviadas ao Laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Saúde (INS), onde foram armazenadas a -80°C.

Os dados sociodemográficos e clínicos foram obtidos em formulário padronizado, contendo as variáveis de interesse (Anexo D), de entre elas, a idade, sexo, proveniência, tipo de alimentação, consumo de água potável, mês de coleta, idade do cuidador, escolaridade do cuidador, estado civil do cuidador, tipo de habitação, agregado familiar, estado de HIV, vacinação contra rotavírus, presença de febre, vômitos, olhos encovados, administração de

soro, desidratação, letargia, prega cutânea, episódio de diarreia e vômitos nas últimas 24 horas, temperatura corporal, estado de desidratação, tratamento e dia de internamento.



**Figura 3.2. Mapa de Moçambique.** Províncias onde as amostras foram coletadas para a ViNaDia em Azul.

### 3.2.3. Tamanho amostral

O tamanho amostral mínimo esperado foi calculado utilizando o programa EpiInfo™ Versão 7.2.3.1 (90), com intervalo de confiança de 95% (IC), efeito de desenho 1, precisão desejada de 5,0% e frequência estimada de 16% para *Enterovírus* associados a diarreia em crianças anos (14).

Com base no número de amostras de crianças menores de cinco anos referenciadas para a ViNaDia no período de estudo (1731 amostras), foi estimado o tamanho mínimo de

204 amostras. No entanto, 327 crianças com diarreia que atenderam os critérios de inclusão foram incluídas para a presente análise.

### 3.2.4. Definição de casos, critérios de inclusão e exclusão

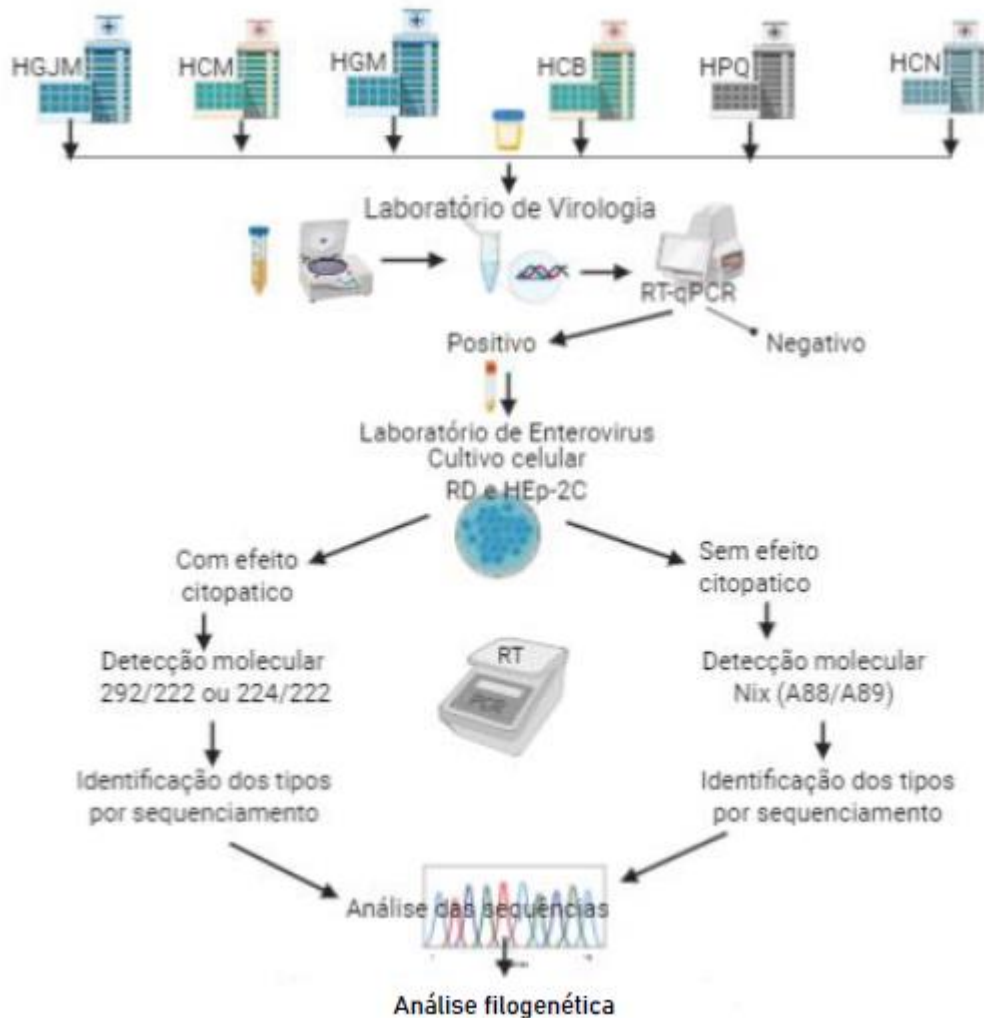
Foram considerados casos de GA na ViNaDia crianças menores de 5 anos de idade, com diarreia, definida por três ou mais episódios de evacuação nas últimas 24 horas, com ou sem sintomas associados, cujo responsável ou cuidador autorizou a participação, mediante a assinatura do TCLE. Os critérios de inclusão e exclusão estão apresentados no Quadro 3.1.

Quadro 3.1. Critérios de inclusão e exclusão do presente estudo.

<b>Critérios de inclusão</b>	<b>Critérios de exclusão</b>
Amostras de crianças menores de cinco anos	Idade igual ou superior a cinco anos
Amostra com volume suficiente para a testagem (mínimo de 2 gramas)	Quantidade menor que dois gramas de fezes
Apresentar formulário de coleta de dados devidamente preenchido	Falta de informação relativa à idade e sexo da criança

### 3.2.5 Processamento das amostras de fezes

O processamento inicial de detecção de enterovírus por RT-qPCR foi realizado no Laboratório de Virologia, do INS, em Moçambique. As amostras positivas foram enviadas em gelo seco ao Laboratório de Enterovírus da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Referência para a região das Américas para Pólio pela OMS (Figura 3.3), onde foi realizado o isolamento viral e caracterização molecular. Todo o processamento seguiu o protocolo padrão estabelecido pela OMS (73).



**Figura 3.3. Fluxograma resumido do processamento das amostras de fezes.** Nesta figura, encontram-se de forma simplificada, as principais etapas realizadas, desde a coleta a caracterização molecular dos enterovírus. HGJM = Hospital Geral José Macamo, HCM = Hospital Central de Maputo, HGM = Hospital Geral de Mavalane, HCB = Hospital Central da Beira, HPQ = Hospital Provincial de Quelimane e HCN = Hospital Central de Nampula.

### 3.2.6 Preparo de suspensões fecais

As suspensões fecais (1%) foram preparadas seguindo o protocolo definido pela OMS (73). Em tubo de centrífuga cônico de 15 mL (tipo Falcon), foram adicionados 1 g de pérolas de vidro, 10 mL de Tampão fosfato-salino, contendo 1% de antibiótico (10.000 µg/mL de Penicilina e 10.000 UI/mL de Estreptomicina), 1 mL de clorofórmio 10 % v/v e 2 g de fezes. O conteúdo foi homogeneizado por 20 minutos em agitador e, em seguida, centrifugado por 25

minutos a 4500 rpm em centrífuga refrigerada à 8 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para tubo de 1,5 mL devidamente identificado. As suspensões fecais foram armazenadas a -20°C para análises posteriores.

### **3.2.7 Extração de RNA viral**

A extração do RNA viral a partir das suspensões fecais foi realizada utilizando o kit QIAamp viral RNA Mini (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

### **3.2.8 Reação de PCR em tempo real (qPCR) para detecção de enterovírus do gênero Enterovírus**

A detecção dos membros do gênero *Enterovírus* foi realizada utilizando a técnica de *One-step* RT-qPCR para amplificação parcial da região 5' NC do genoma com iniciadores e sondas previamente publicados (Apêndice A) (91).

Para a amplificação, utilizou-se uma microplaca de 96 cavidades de 0,2 mL. Em cada cavidade, foram adicionados 9 µL de RNA viral, 2,5 µL da mistura de iniciadores e sonda, 12,5 µL de tampão 2X RT-PCR e 1 µL da enzima AgPath-ID™ *One-Step* 25X RT-PCR, totalizando 25 µL de reação.

Todas as reações foram realizadas no equipamento Real Time 7500 (*Applied Biosystems*) nas condições descritas no Apêndice A. Amostras que apresentaram valores de (C<sub>T</sub>) menor ou igual a 40 foram consideradas positivas (91). A reação foi acompanhada de controles positivos, negativos e um controle interno para avaliação da eficiência da reação, dos reagentes e possíveis contaminações.

### **3.2.9 Isolamento em cultura de células**

Amostras positivas pela RT-qPCR foram inoculadas em linhagens celulares escolhidas por permitirem a propagação de enterovírus, como referenciado no Manual de Diagnóstico da Rede de Laboratórios de Referência para Poliomielite da OMS (73).

Foram utilizadas duas linhagens: célula de linhagem contínua proveniente de rabdiosarcoma humano (RD) e célula de carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp2C). Estas células foram fornecidas ao Laboratório de Enterovírus da Fiocruz pelo *Center for Disease Control and Prevention (CDC)*, Atlanta, Estados Unidos de América.

O volume de 0,2 mL de amostra foi inoculado em tubos contendo 1,8 mL de uma suspensão de  $11 \times 10^4$  células/ mL da linhagem RD ou HEp2C. Os tubos inoculados foram incubados a 37 °C em estufa e foram realizadas leituras diárias para verificação do efeito citopático, com o auxílio do microscópio invertido, por sete dias consecutivos nas linhagens celulares (73).

Durante o período de leitura diária, verificou-se a existência de efeito citopático característico de enterovírus nas amostras, como células apresentando-se arredondadas, enrugadas, picnose nuclear, degeneração e deslocamento da monocamada do suporte.

Posteriormente, foram feitos três ciclos de congelamento e descongelamento rápido, em gelo seco e álcool, antes da inoculação na segunda passagem em cultura celular. Em seguida, leituras diárias dos tubos foram realizadas por mais sete dias. Um controle celular, constituído apenas de células e meio mínimo essencial foi utilizado como controle negativo.

### **3.2.10 Caracterização molecular de tipos dos enterovírus**

Todas as amostras que apresentaram com efeito citopático foram submetidas a protocolos de PCR convencional precedidos de transcrição reversa (RT-PCR) para detecção de enterovírus. Todas as reações foram realizadas no termociclador Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

A síntese de cDNA foi realizada a partir de RNA viral extraído da suspensão celular de todas as culturas conforme **item 3.2**. Para isso, a mistura de 9 µL do RNA viral e 1 µL do iniciador Random (Promega) a 100 pmoles/ µL foi homogeneizada e submetida a uma incubação de 65 °C por 10 min. Posteriormente, adicionou-se no tubo 4,0 µL de tampão 5X “first strand c-DNA” (Invitrogen), 2,0 µL de Di-Thio-Treitol à 0,1M (DTT, Invitrogen), 1,5 µL de dNTP's à 10 mM/ µL (Invitrogen), 0,5 µL de *RNAse out* a 40U/ µL (Promega) e 1,0 µL de água deionizada autoclavada. Após a homogeneização, a mistura foi incubada a 50 °C por 10 min. Em seguida, adicionou-se 1,0 µL da *SuperScript II reverse Transcriptase* (Invitrogen) a 20 U/ µL e a mistura foi incubada por 42 °C por 50 min. No final, o cDNA foi armazenado a -20 °C.

Para amostras que apresentaram efeito citopático, a PCR para detecção de enterovírus incluiu os iniciadores 292/222 (Apêndice E) para amplificação de 357pb no gene da proteína VP1 (22). Em resumo, a mistura contendo 3 µL de cDNA, 25 µL enzima Go Taq® Green Master Mix (Promega), 1,0 µL do iniciador 292 à 50 pmoles/ µL, 1,0 µL do iniciador

222 à 50 pmoles/ $\mu$ L e 20  $\mu$ L de água deionizada e autoclavada foi submetida a reação de PCR nas condições de amplificação descritas no Apêndice A.

As amostras negativas no RT-PCR foram submetidas à nova reação utilizando os iniciadores 224/222 para amplificação de um fragmento de 660pb (Apêndice A). A mistura da reação incluiu os mesmos reagentes e volumes da reação anterior, com exceção dos iniciadores, e foi submetida à reação de PCR como descrito no Apêndice A (22).

Para as amostras que não apresentaram efeito citopático no cultivo celular, foi realizada *nested* PCR utilizando os iniciadores 224/222 na primeira reação e os iniciadores A89/A88 na segunda reação, para amplificação de fragmentos de 348 a 393pb, respectivamente do gene que codifica para a VP1. Nas condições de amplificação descritas no Apêndice A (42).

#### **3.2.10.1 Visualização dos amplicons por eletroforese em gel de agarose**

Para análise dos produtos da PCR, adicionou-se 2  $\mu$ L do corante azul de bromofenol a 50  $\mu$ L de produto. Essa mistura foi aplicada em gel de agarose 1 % contendo brometo de etídio (1,0  $\mu$ g/ mL) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. O peso molecular de 100 bp (Invitrogen) foi utilizado como marcador de referência.

A corrida da eletroforética foi conduzida a 90 V em TAE 1X por 45 minutos. Os *amplicons* foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

#### **3.2.10.2 Purificação dos produtos da PCR**

Os *amplicons* de tamanho esperado foram excisados do gel de agarose e purificados com o uso do Kit *QIAquick® Gel Extraction* (Qiagen), de acordo com as orientações do fabricante.

#### **3.2.10.3 Quantificação do DNA purificado**

Os produtos purificados foram quantificados por comparação com o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) através de corrida eletroforética em gel de agarose 1%, corado em brometo de etídio (1,0  $\mu$ g/ mL) e posterior visualização das bandas sob a incidência da luz ultravioleta. A corrida eletroforética foi realizada a 90 Volts em TAE 1X por 45 min.



#### **3.2.10.4 Reações de sequenciamento**

Utilizou-se o kit *ABI BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1* (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

As reações foram realizadas com 1,0 µL do iniciador (222/224/292 e A89/A88), 1,0 µL do tampão de sequenciamento fornecido pelo kit, 2,0 µL do *Big Dye® Terminator*, o DNA quantificado e água deionizada, se necessário para completar o volume final de 10 µL. As condições de amplificação estão descritas no Anexo E.

Os produtos das reações do sequenciamento foram precipitados utilizando o kit *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1* e enviados para a Plataforma de Sequenciamento do DNA PDTIS/Fiocruz. Os produtos das reações de sequenciamento foram lidos no sequenciador automático 3730XL DNA Analyser Hitachi (Applied Biosystems).

#### **3.2.10.5 Identificação dos tipos e análise filogenética dos enterovírus**

Após a obtenção das sequências nucleotídicas, elas foram analisadas utilizando o programa BioEdit. As sequências foram editadas e comparadas com sequências protótipo depositadas na base de dados do GenBank® pelo uso do programa *BLASTN* 2.5.0 para identificação do respectivo tipo viral (92).

As sequências nucleotídicas originais dos isolados virais em amostras de fezes descritos neste trabalho foram depositadas no GenBank com os seguintes números de acesso: MT822164 - 74, MT876336 - 49 e MT943116 - 28.

O alinhamento das sequências foi realizada utilizando o programa MAFFT (v7.450) (93) no *Geneious prime* 2020.0.3. Os modelos de substituição de nucleotídeo foram escolhido através do *J modeltest* (94) e as árvores de máxima verossimilhança foram geradas usando o programa *Randomized Accelerated Maximum Likelihood* (RAxML) para amostras de fezes (95), usando o modelo de substituição GTR+G. Posteriormente visualizado no *Figtree version 1.4.4* (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

#### **3.2.11 Composição da casuística e análise da gravidade da diarreia**

No presente estudo, 327 crianças que tiveram amostras fecais coletadas foram selecionadas de acordo com os critérios de inclusão. Destas, 189 amostras tiveram resultados negativos para os agentes testados anteriormente na vigilância e 138 foram positivas para um ou mais agentes entéricos, com especial destaque para o rotavírus.

A gravidade do quadro de diarreia nas amostras positivas para enterovírus foi aferida através da utilização da escala de Ruuska e Vesikari, e comparou-se com o quadro do rotavírus, o principal agente causador de diarreia em crianças menores de cinco anos.

Os pacientes foram examinados quanto à febre, número de episódios e duração de vômitos e diarreia, desidratação e tratamento para verificar a gravidade da doença segundo a escala de Ruuska e Vesikari (Apêndice F) (8). A gravidade foi categorizada nos níveis leve (0 a 5 pontos), moderado (6 a 10 pontos), grave (11 a 15 pontos) e muito grave (16 a 20).

### **3.2.12. Dados meteorológicos**

Os dados referentes aos fatores climáticos no período de estudo foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia de Moçambique e incluíram as médias mensais de umidade relativa (%), precipitação (mm) e temperatura (°C) ([www.inam.gov.mz](http://www.inam.gov.mz)).

### **3.2.13. Análises estatísticas**

Os dados foram introduzidos na base no *software* Epi Info™ 3.5.1 por dois digitadores devidamente instruídos para garantir a dupla entrada e validados pelo autor desta tese.

Foram feitas análises exploratórias para a descrição das características sociodemográficas e clínicas da população do estudo. Os resultados foram sumarizados em tabelas de frequências absolutas, relativas, médias (e desvio padrão) e medianas (e o intervalo interquartil), quando aplicável.

Tabelas de contingências entre as variáveis nominais e ordinais com a variável independente (estado de infecção para enterovírus) foram criadas. Possíveis associações entre variáveis e desfecho foram realizadas análises bivariada e teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, de acordo com aplicabilidade.

Para as variáveis quantitativas, foi utilizado o teste T para comparação entre grupos, ou o seu alternativo não paramétrico Mann-Whitney-U, quando não se cumpriam os pressupostos destes testes, a normalidade e homogeneidade.

Foi realizado o teste t de *Student* e a análise de variância (ANOVA 1-way) com o objetivo de se detectar diferenças entre as médias de Ciclo *threshold* ( $C_T$ ) para as diversas variáveis analisadas.

Para os parâmetros meteorológicos, foi feita a correlação de Pearson e de Spearman (com Lag de 1 e 2 meses) entre as variáveis climáticas e a infecção por enterovírus. O intervalo de confiança de 95% e 5% de nível de significância foram estimadas em todas as análises.

Foram consideradas estatisticamente significativas todas as análises com p-valor inferior a 5%. Todas as análises foram feitas com recurso ao programa estatístico IBM SPSS (Statistical Package for the Social Science, Armonk, NY: IBM Corp, 2011), versão 26.0.

### **3.3 Estudo ambiental**

#### **3.3.1. Tipo de estudo e amostragem**

Um estudo transversal foi realizado com amostras de esgoto bruto obtidas no período de janeiro a novembro de 2018, na cidade de Maputo, capital do país, com uma área de 34 677km<sup>2</sup> e população de 1.120.867 habitantes (80,88).

As amostras foram obtidas em três pontos da cidade que representavam áreas com maiores abrangência na coleta pelo sistema do esgoto da cidade de Maputo: Estação de Tratamento de Águas de Residuais do Influyente (ETAR) e pontos de lançamento ao mar nas Avenidas Marginal e 10 de Novembro (Figura 3.4).



Figura 3.4. Pontos de coleta de amostras de esgoto bruto. Em alfinetes amarelos estão representados os pontos de lançamento nas Avenidas 10 de Novembro e Marginal e na ETAR. A letra H representada em vermelho mostra os Hospitais onde as amostras de fezes foram coletadas.

No ETAR estas águas são reutilizadas pelos grupos de pequenos agricultores, produtores de hortícolas que fornecem a cidade posteriormente, enquanto onde efluente da Avenida 10 de Novembro lança ao mar estas águas são pelos são utilizadas para recreação pelos banhistas. As coletas foram autorizadas pelas autoridades municipais do Departamento de Água e Saneamento do Conselho Municipal da Cidade de Maputo (Apêndice G).

O sistema de esgoto na cidade de Maputo abrange principalmente a área metropolitana de Maputo. E águas dos esgotos das unidades hospitalares não possuem um sistema de esgoto próprio, sendo estas águas canalizadas ao sistema existente na cidade.

Amostras simples de 1L foram coletadas quinzenalmente, de forma manual, pela submersão direta da garrafa na água alguns centímetros abaixo da superfície, em posição

contrária da corrente da mesma (63). As amostras foram transportadas a 4°C até o Laboratório de Virologia do INS – Moçambique.

### 3. 3.2. Processamento de amostras ambientais

As amostras de esgoto foram concentradas no Laboratório de Virologia no INS em Moçambique, a posterior as amostras foram transportadas em gelo seco até ao Laboratório de Enterovírus, Fundação Oswaldo Cruz, onde foi realizado o isolamento e caracterização molecular conduzido conforme ilustrado no fluxograma na figura 3.5.

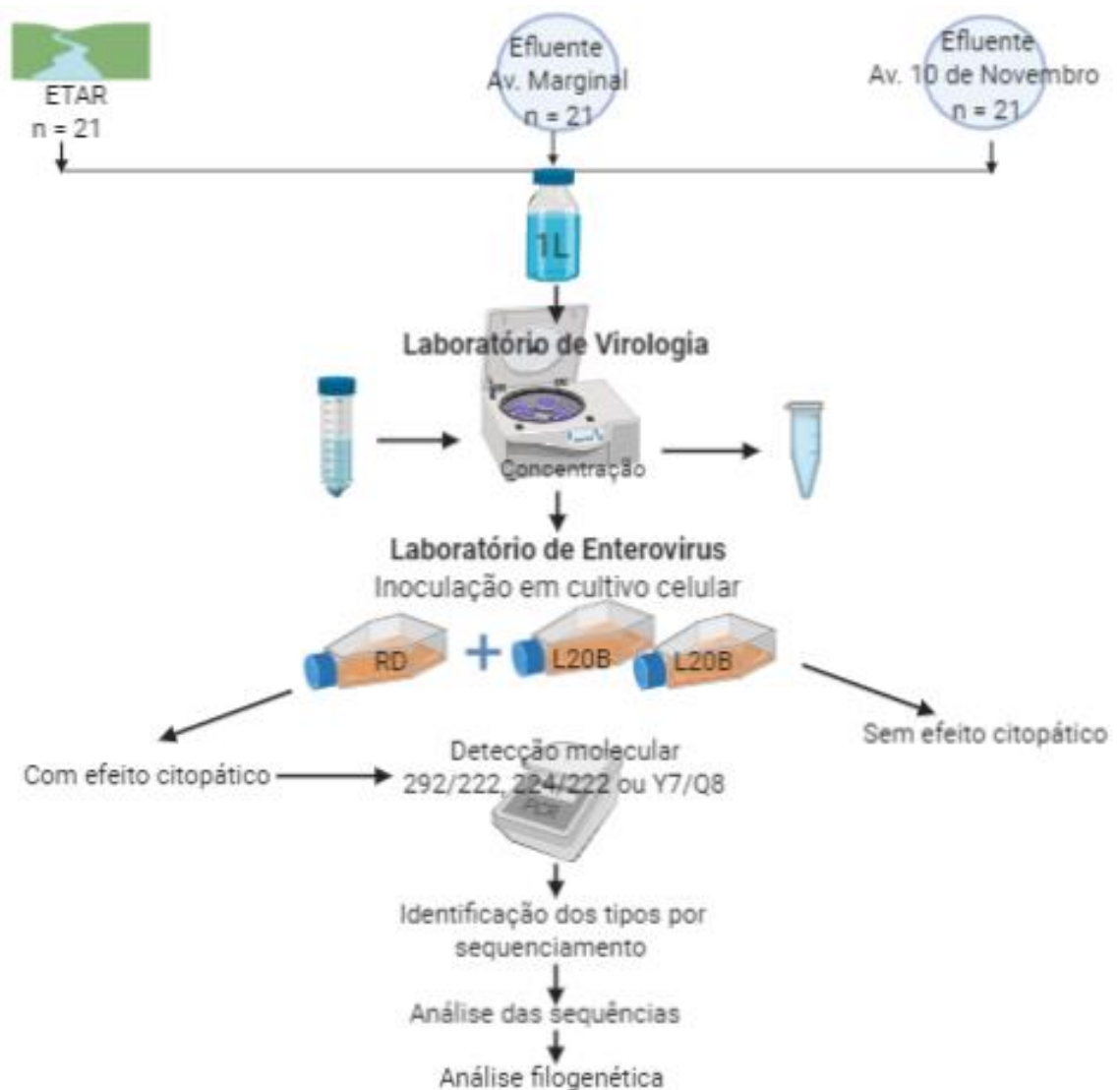


Figura 3.4. Fluxograma resumido de processamento das amostras ambientais. Nesta figura, encontram-se, de forma simplificada, as principais etapas realizadas, desde a concentração a caracterização molecular dos enterovírus.

### 3.3.3 Concentração de amostras

As amostras de esgoto foram concentradas pelo método de adsorção por sílica, com algumas modificações, que se baseia na adsorção do RNA usando as propriedades do ácido nucleico de se ligar a superfícies eletromagnéticas após a adição de sais catiônicos (70,96).

A amostra foi alíquotada em dois volumes de 500 mL, sendo uma conservada na geladeira a 4 °C (até ao final da concentração) e a outra utilizada para concentração. Para concentração, foram adicionados 500µL de solução de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) a 500mM nos 500 mL de esgoto.

O pH foi ajustado para 3,5 com o uso do HCl 1N. Em seguida, foram adicionados 250 µL de dióxido de silício (SiO<sub>2</sub>). A amostra foi homogeneizada por 30 min a 4 °C, com auxílio de um agitador magnético. O volume final foi alíquotado em tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugados a 1500 x g por 5 min a 4 °C em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* ressuspensos em 3 mL de solução de glicina a 50 mM (pH 9,5) contendo 3% de extrato de carne.

O tubo foi homogeneizado vigorosamente por 20 min e centrifugado a 1500 x g por 5 min a 4 °C em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi transferido para um tubo cônico de 15 mL e o pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 1N.

Foram realizadas três etapas de clarificação, por adição de 3 mL de clorofórmio puro, homogeneização por 10 min e centrifugação a 1500 x g por 5 min a 4°C. Após a centrifugação da terceira etapa de clarificação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrífuga de 15 mL.

Para cada mL da amostra foram adicionados 10 µL de antibiótico (10.000UI/mL estreptomicina/10.000µg/mL penicilina). Após esta etapa, os concentrados em volume aproximado a 5mL foram conservados em criotubos de 2 mL e armazenados a -80°C até o envio ao Laboratório de Referência de Enterovírus para posterior inoculação em cultivo celular.

### 3.3.4 Inoculação das amostras ambientais em cultura celular

Quinhentos µL de concentrado foram inoculados em garrafas de poliestireno (25 cm<sup>2</sup>, Nalgene), estéreis e descartáveis, contendo uma suspensão celular de 10 x 10<sup>5</sup> células/ mL em 5mL de meio de manutenção a 2% de RD ou L20B (células L de camundongo geneticamente modificadas que expressam um receptor humano para poliovírus).

As garrafas foram incubadas a 37 °C, e as células observadas diariamente por sete dias para verificar a presença do efeito citopático com auxílio do microscópio invertido. Após os primeiros sete dias, foi realizada a segunda passagem nas linhagens celulares RD e L20B.

Para as amostras que apresentaram efeito citopático (feito realizado o cruzamento entre as linhagens celulares, ou seja, após criar efeito citopático) em RD, 500 µL da suspensão foi retirada e inoculada na linhagem L20B e vice-versa, como recomendado pelo algoritmo de isolamento da OMS (22,63).

### **3.3.5 Caracterização molecular dos tipos dos enterovírus**

A partir dos isolados que apresentaram efeito citopático, foram realizadas a extração do RNA viral e amplificação por RT-PCR e caracterização molecular por sequenciamento, conforme **itens 3.2.7, 3.2.10 a 3.2.15**

Em amostra positiva para o poliovírus, a síntese do cDNA foi realizada conforme **item 3.2.10**, exceto o iniciador, que, para esta etapa, foi 1,0 µL de Oligo-dT (Promega) a 100 pmoles/µL. Em seguida, a PCR foi realizada utilizando as mesmas quantidades dos reagentes descritos no **item 3.2.10**, exceto os iniciadores, que para esta etapa foram Q8 e Y7, e as condições de amplificação estão descritas no Apêndice A.

A avaliação dos amplicons e as reações de sequenciamento estão descritas nos **itens 3.2.11 e 3.2.12 a 3.2.14**. As sequências nucleotídicas originais dos isolados virais em amostras ambientais descritos neste trabalho foram depositadas no GenBank com os seguintes números de acesso: MN701060 - 61, MN701064 - 66, MN701068 - 70, MN745077, MN888071 - 86.

A identificação dos tipos e análise filogenética dos enterovírus foi realizada como descrito no **item 3.2.10.5**, porém a árvore de máxima verossimilhança foi gerada usando o programa Phyml (96) usando o método de máxima verossimilhança e o modelo Kimura 2 parâmetros e uma distribuição Gama discreta foi utilizada para modelar diferenças de taxa evolutiva (97). Posteriormente visualizado no Figtree version 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

A caracterização do isolado de PVs como vacinal, VDPV ou cepas selvagens foi obtida com a comparação com cepas de protótipos depositadas no banco de dados

GenBank® e a análise da presença de mutações no gene VP1 foi realizada em comparação ao protótipo AY184219 (92,98).

### **3.3.6 Análises estatísticas**

Para análises estatísticas foram utilizados os mesmos testes descritos no **item 3.2.18**.



## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Estudo com amostras clínicas**

#### **4.1.1. Características sociodemográficas e clínicas dos participantes do estudo**

Foram incluídas 327 amostras de crianças com diarreia, coletadas entre junho de 2014 e março de 2018 nas províncias de Maputo, Nampula, Sofala e Zambézia, provenientes da ViNiDia. Sendo que 138 (42,2%) apresentavam resultado positivo para outros agentes entéricos e 189 (57,8%) negativo para outros agentes entéricos testados na Vigilância Nacional de diarreia em Moçambique.

As características sociodemográficas e clínicas da população do estudo estão apresentadas na Tabela 4.1. A maior parte das crianças eram do sexo masculino (58,4%) e faixa etária de 0 aos 11 meses de idade (48,9%). A alimentação foi diversificada na sua maioria (89,3%), assim como o consumo de água potável (85,0%).

Os cuidadores tinham idade entre 15 e 24 anos (44,3%), a maioria era casada (73,1%), e com educação formal (90,5%). Pertenciam a famílias com, pelo menos, cinco pessoas (54,1%). Perfil semelhante foi observado para o tipo de casa nas quais as crianças viviam (casas precárias ou de alvenaria).

A maioria das crianças eram da província de Nampula (39,1%), após a introdução da vacina contra rotavírus (85,0%) e na estação seca (54,7%). Com relação às características clínicas das crianças (Tabela 4.1), a maioria apresentou olhos encovados (64,8%), relatou episódios de vômito (62,4%) e apresentou estado de desidratação moderado.

O período de internação foi inferior a cinco dias (55%) e a maioria era negativa para HIV (62,1%). A maioria não apresentou febre (59,3%), letargia (72,2%) e prega cutânea (56,9%). A maioria apresentava resultado negativo tanto para rotavírus (79,2%) como para outros vírus, bactérias e parasitos (57,8%) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Características sociodemográficas e clínicas da população do estudo, em Moçambique entre 2014 a 2018.

<b>Características</b>	<b>N = 327</b>	<b>%</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	191	58,4
Feminino	136	41,6
<b>Idade (meses)</b>		
0-11	160	48,9
12-23	115	35,2
24-59	52	15,9
<b>Província</b>		
Maputo	106	32,4
Sofala	29	8,9
Zambézia	64	19,6
Nampula	128	39,1
<b>Tipo de alimentação</b>		
Leite materno	16	4,9
Leite artificial	8	2,4
Misto (leite materno + artificial)	11	3,4
<i>Diversificado</i>	292	89,3
<b>Consumo de água potável</b>		
Não	49	15,0
Sim	278	85,0
<b>Estado de HIV*</b>		
Negativo	203	62,1
Positivo	27	8,3
<b>Febre*</b>		
Não	194	59,3
Sim	129	39,4
<b>Vômito *</b>		
Não	115	35,2
Sim	204	62,4
<b>Olhos encovados*</b>		
Não	69	21,1
Sim	212	64,8
<b>Letargia*</b>		
Não	236	72,2
Sim	33	10,1
<b>Prega cutânea*</b>		
Não	186	56,9
Sim	75	22,9
<b>Desidratação*</b>		
Nenhuma	7	2,1
Moderada	163	49,8
Severa	58	17,7

<b>Hospitalização (dias)</b>		
<5	180	55,0
>=5	105	32,1
<b>Idade do cuidador (anos)*</b>		
15-24	145	44,3
25-34	124	37,9
>= 35	37	11,3
<b>Estado civil do cuidador*</b>		
Solteira	77	23,5
Casada	239	73,1
Divorciadas/viúvas	10	3,1
<b>Educação formal do cuidador</b>		
Não	31	9,5
Sim	296	90,5
<b>Tipo de casa*</b>		
Casas precárias (barro ou caniço)	158	48,3
Casas de alvenaria	164	50,2
<b>Membros do agregado familiar*</b>		
< 5	142	43,4
>= 5	177	54,1
<b>Época do ano</b>		
Chuvosa	148	45,3
Seca	179	54,7
<b>Outros patógenos entéricos</b>		
Negativo	189	57,8
Positivo	138	42,2
<b>Período vacinal (meses)</b>		
Pré	49	15,0
Pós	278	85,0
<b>Vacinação contra Rotavírus*</b>		
Sim	168	51,4
Não	130	39,8
<b>Diagnóstico de Rotavírus</b>		
Negativo	259	79,2
Positivo	68	20,8

\*não havia informação de todas as crianças.

#### 4.1.2. Detecção de enterovírus e sua associação à características sociodemográficas e clínicas dos participantes do estudo

A frequência de enterovírus em casos de diarreia foi de 15,9 % (52/327). Os anos de 2017 e 2018 apresentaram o menor (14,9%) e maior (21,7%) percentual de detecção e não houve amostra positiva em 2014 (Figura 4.1).

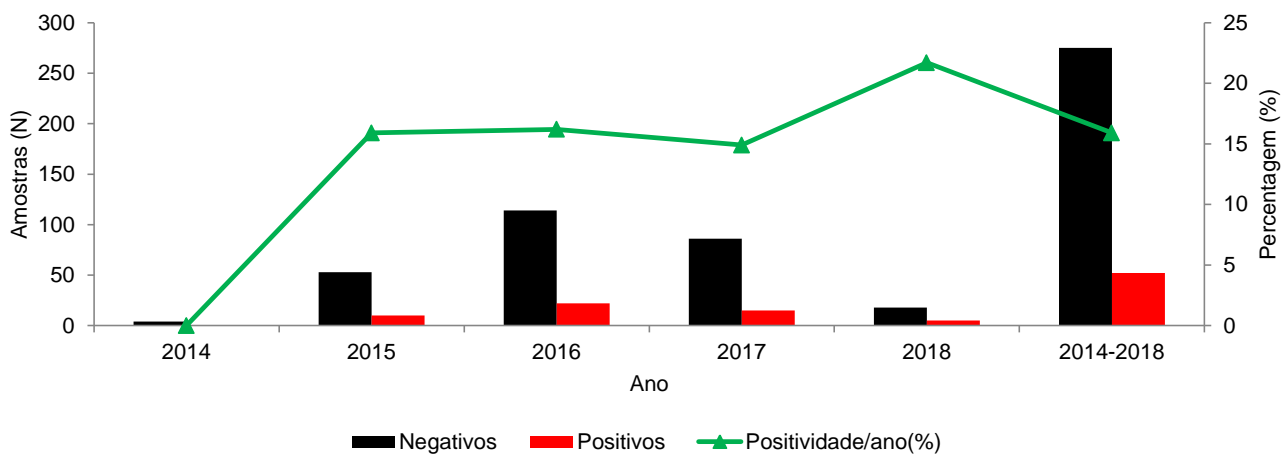


Figura 4.1. Detecção de enterovírus em crianças, segundo o ano de coleta em Moçambique, entre 2014 – 2018.

As associações entre as características sociodemográficas e clínicas e a presença de enterovirus na análise bivariada, encontram-se descritas na Tabela 4.2.

Não houve diferenças significativas entre os sexos. A faixa etária significativamente mais afetada foi a de 12 a 23 meses, apresentou maior prevalência (20,9%) e 95% maior chance, sendo estatisticamente significativo. A faixa etária 24 a 59 meses, apresentou uma prevalência de 17,3% e 55% de maior chance que a faixa dos 0 a 11 meses apesar de não ser estatisticamente significativo.

As crianças que vivem nas províncias de Sofala e Zambézia apresentaram maior prevalencia dos enterovirus 20,7% e 20,3 % respectivamente, apresentando 25% e 20% de maior chance de infecção que as crianças da província de Maputo, porém não foi estatisticamente significativo (Tabela 4.2).

As crianças que não têm acesso a água potável apresentaram maior prevalência de infecção por enterovírus (18,4%) e 25% maior chance de infecção, apesar de não ser estaticamente significativa (Tabela 4.2).

As crianças cuidadas por mães com idade abaixo dos 35 anos apresentaram menor prevalência de infecção por enterovírus (14,5 e 16,1%, respectivamente), e menor chance de infecção 48% (15 a 24 anos) e 41% (25 a 35 anos), ainda assim não foi estatisticamente significativo.

As crianças cuidadas por mães sem educação formal tiveram um maior prevalência de infecção por enterovírus (22,6%) e maior chance de infecção (62%) quando comparado ao grupo de mães com educação formal, apesar de não ter sido estatisticamente significativo.

As crianças HIV positivas tiveram maior prevalência de infecção pelo enterovírus (22,2%) e 58% maior chance de infecção em relação as crianças HIV negativas, todavia não foi estatisticamente significativo.

Crianças cujas suas amostras foram coletadas após a introdução da vacina contra o rotavírus (setembro de 2015) apresentaram maior prevalência de infecção pelo enterovírus (16,9%) e 79% maior chance de infecção, no entanto não sendo estatisticamente significativo.

Tabela 4.2 Características sociodemográficas, análise bivariada para infecção por enterovírus em casos de diarreia em Moçambique, entre 2014 a 2018.

<b>Características</b>	<b>N = 327</b>	<b>EV Positivo n (%)</b>	<b>OR simples (95% CI)</b>
<b>Sexo</b>			
Masculino	191	30 (15,7)	Ref
Feminino	136	22 (16,2)	1,036 (0,568 - 1,887)
<b>Idade (meses)</b>			
0-11	160	19 (11,9)	Ref
12-23	115	24 (20,9)	1,957 (1,015 - 3,776) <sup>a</sup>
24-59	52	9 (17,3)	1,553 (0,655 - 3,683)
<b>Província</b>			
Maputo	106	11 (10,4)	Ref
Sofala	29	6 (20,7)	2,253 (0,754 - 6,728)
Zambézia	64	13 (20,3)	2,201 (0,920 - 5,265)
Nampula	128	22 (17,2)	1,792 (0,826 - 3,890)
<b>Tipo de alimentação</b>			
Leite materno	16	2 (12,5)	Ref
Leite artificial	8	0 (0,0)	NA
Misto (leite materno + artificial)	11	0 (0,0)	NA
Diversificado	292	50 (17,1)	1,446 (0,319 - 6,564)
<b>Consumo de água potável</b>			
Não	49	9 (18,4)	1,230 (0,557 - 2,717)
Sim	278	43 (15,5)	Ref

<b>Época do ano</b>			
Chuvosa	148	26 (17,6)	1,254 (0,693 - 2,270)
Seca	179	26 (14,5)	Ref
<b>Tipo de casa <sup>b</sup></b>			
Casas precárias (barro ou caniço)	158	28 (17,7)	1,256 (0,693 - 2,278)
Casas de alvenaria	164	24 (14,6)	Ref
<b>Membros do agregado familiar <sup>b</sup></b>			
< 5	142	24 (16,9)	1,130 (0,620 - 2,060)
>= 5	177	27 (15,3)	Ref
<b>Estado do HIV</b>			
Negativo	203	31 (15,3)	Ref
Positivo	27	6 (22,2)	1,585 (0,592 - 4,243)
<b>Vacinação contra Rotavírus<sup>b</sup></b>			
Não	168	27 (16,1)	1.191 (0.625 - 2.273)
Sim	130	18 (13,8)	Ref
<b>Período vacinal (meses)</b>			
Pré	49	5 (10,2)	Ref
Pós	278	47 (16,9)	1,790 (0,674 - 4,755)
<b>Estado do HIV</b>			
Negativo	203	31 (15,3)	Ref
Positivo	27	6 (22,2)	1,585 (0,592 - 4,243)
<b>Vacinação contra Rotavírus<sup>b</sup></b>			
Não	168	27 (16,1)	1.191 (0.625 - 2.273)
Sim	130	18 (13,8)	Ref
<b>Período vacinal (meses)</b>			
Pré	49	5 (10,2)	Ref
Pós	278	47 (16,9)	1,790 (0,674 - 4,755)
<b>Idade do cuidador (anos)<sup>b</sup></b>			
15-24	145	21 (14,5)	0,527 (0,218 - 1,273)
25-34	124	20 (16,1)	0,598 (0,246 - 1,458)
>=35	37	9 (24,3)	Ref
<b>Educação formal</b>			
Não	31	7 (22,6)	1,627 (0,662 - 4,000)
Sim	296	45 (15,2)	Ref
<b>Estado civil<sup>b</sup></b>			
Solteira	77	9 (11,7)	Ref
Casada	239	40 (16,7)	1,519 (0,701 - 3,292)
Divorciadas/viúvas	10	2 (20,0)	1,889 (0,346 - 10,322)

<sup>a</sup>p < 0,045; e <sup>b</sup> não havia informação para todas as crianças.

No que diz respeito às características clínicas, os resultados demonstraram uma relação inversa entre detecção de enterovírus e detecção de rotavírus ( $p=0,011$ ) e outros agentes etiológicos ( $p=0,001$ ) (Tabela 4.3). Co-deteção enterovírus e rotavírus e outros

patógenos entéricos foram encontradas em 5,9% e 6,5% das amostras, respectivamente, ilustrando possível associação destes vírus com a doença diarreica.

Tabela 4.3 Associações entre características clínicas e presença de enterovírus em crianças de Moçambique entre 2014 a 2018.

<b>Características</b>	<b>N = 327</b>	<b>EV positivo n (%)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Febre*</b>			0,983
Não	194	31 (16,0)	
Sim	129	21 (16,3)	
<b>Vomito*</b>			0,452
Não	115	15 (13,0)	
Sim	204	33 (16,2)	
<b>Olhos encovados*</b>			0,579
Não	69	12 (17,4)	
Sim	212	31 (14,6)	
<b>Administração de SRO</b>			0,426
Sim	152	27 (17,8)	
Não	133	19 (14,3)	
<b>Letargia *<sup>a</sup></b>			0,596
Não	236	33 (14,0)	
Sim	33	6 (18,2)	
<b>Prega cutânea *</b>			0,675
Não	186	26 (14,0)	
Sim	75	12 (16,0)	
<b>Desidratação *<sup>a</sup></b>			0,676
Nenhuma	7	1 (14,3)	
Moderada	163	23 (14,1)	
Severa	58	11 (19,0)	
<b>Hospitalização (dias)*</b>			0,577
<5	180	28 (15,6)	
>=5	105	19 (18,1)	
<b>Outros patógenos entéricos*</b>			0,001
Negativo	189	43 (22,8)	
Positivo	138	9 (6,5)	
<b>Diagnóstico de rotavírus</b>			0,011
Negativo	259	48 (18,5)	
Positivo	68	4 (5,9)	

\* não havia informação para todas as crianças; <sup>a</sup>Teste exato de Fisher.

Análises realizadas em relação ao C<sub>T</sub> não foram detectadas diferenças significativas nas médias das variáveis seguintes: sexo, faixa etária, temperatura corporal, estado do HIV, membros do agregado familiar, consumo de água potável, período de

hospitalização, infecção prévia por rotavírus ou outros agentes entéricos, com exceção do período vacinal. Houve diferença significativa entre as médias de  $C_T$  para os períodos pré-vacinal (média=15,25) e pós-vacinal (média=21,23) com o valor de  $p=0,04$  (Figura 4.2).

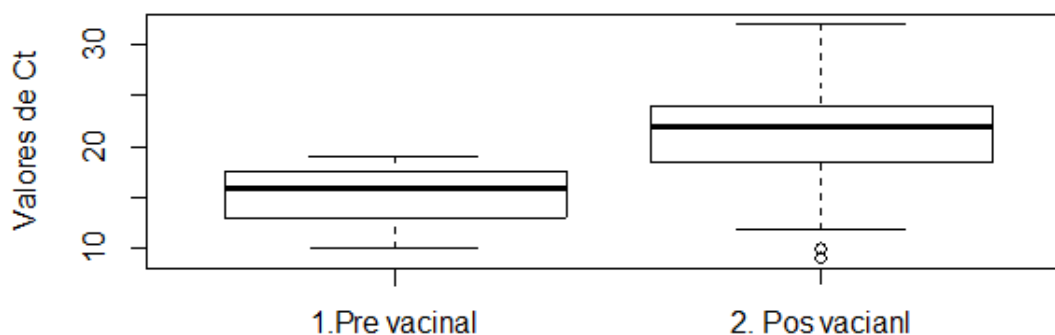


Figura 4.2. Valores médios dos  $C_T$  dos enterovírus detectados por qRT-PCR no período pré e pós introdução da vacina contra rotavírus.

#### 4.1.3. Gravidade da doença diarreica na infecção por enterovírus

O quadro da infecção por enterovírus nos participantes foi considerada grave nas diferentes faixas etárias segundo a escala de Ruuska e Vesikari (Tabela 4.4).

A infecção por enterovírus foi mais frequente na faixa etária dos 12-23 meses ( $p=0.045$ ). Nesta faixa etária, também foi observada maior duração da diarreia e hospitalização em dias, apesar de não ser estatisticamente significativa.

Por outro lado, a infecção por rotavírus foi maior na faixa etária dos 0-11 meses, cujas crianças apresentaram maior número de episódios de diarreia em 24 horas e maior período de hospitalização (Tabela 4.4).



Tabela 4.4. Gravidade da doença em crianças positivas para enterovírus em crianças com diarreia entre 2014 a 2018, em Moçambique.

<b>Faixas etárias</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>EV positivo</b>	<b>RV Positivo</b>	<b>Co-deteccção EV vs. RV</b>	<b>Co- deteccção EV e Outros<sup>a</sup></b>
0-11 (meses)	Nº de crianças	15	46	2,0	2,0
	Média da diarreia (dias)	3,5	2,8	2,0	1,5
	Média de episódios (24hr)	4,5	5,1	4,5	2,5
	Média de vômitos (dias)	2,8	2,8	1,0	1,5
	Média de episódios (24hr)	2,7	4,0	4,0	2,0
	Temperatura corporal (°C)	37,3	37,1	37,1	36,8
	Escala de Ruuska e Vesikari <sup>b</sup>	12	12	9,0	9,0
	Hospitalização (dias)	4,8	5,4	6,5	2,0
12-23 (meses)	Nº de crianças	20	14	2,0	2,0
	Média da diarreia (dias)	3,4	1,8	1,0	1,0
	Média de episódios (24hr)	4,6	5,4	4,0	3,5
	Média de vômitos (dias)	1,9	2,0	1,0	1,0
	Média de episódios (24hr)	3,0	2,3	4,5	2,5
	Temperatura corporal (°C)	37,2	37,0	36,9	38,0
	Escala de Ruuska e Vesikari <sup>b</sup>	11	11	10	10
	Hospitalização (dias)	5,5	4,2	2,0	5,5
24-59 (meses)	Nº de crianças	8,0	4,0	0,0	1,0
	Média da diarreia (dias)	3,0	2,0	NA	1,0
	Média de episódios (24hr)	4,3	4,3	NA	4,0
	Média de vômitos (dias)	1,3	1,0	NA	NA
	Média de episódios (24hr)	5,6	3,0	NA	NA
	Temperatura corporal (°C)	37,1	37,5	NA	38,7
	Escala de Ruuska e Vesikari <sup>b</sup>	12	11	NA	9,0
	Hospitalização (dias)	5,9	5,8	NA	6,0

EV = enterovírus; RV = rotavírus; <sup>a</sup> Outros agentes excluindo o rotavírus; <sup>b</sup> Em todos os grupo foi considerado com desidratação moderada e quanto ao tratamento como tendo requerido internamento (considerando 2 pontos). Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos.

#### 4.1.4. Distribuição geográfica e associação a fatores ambientais

Foi encontrada uma relação significativa entre temperatura e prevalência de enterovirus (RHO=0,44, p=0,004) para o banco geral, usando a Lag de 1 e 2 meses. Usando a correlação de Person sem Lag verificou-se uma correlação positiva estatisticamente significativa entre a detecção de EV e temperatura (p=0,006). Entretanto, os resultados variaram de acordo com a província estudada (Tabela 4.5).

Table 4.5. Correlação entre fatores climáticos e infecção por enterovirus, entre 2014 a 2018 em Moçambique

Parâmetros	Maputo		Nampula		Sofala		Zambézia		Global	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Precipitação (mm)	0.395	<b>0.028</b>	0.133	0.468	-0.425	0.130	0.416	0.060	0.252	0.108
Temperatura (°C)	0.353	0.051	0.151	0.410	-0.414	0.159	0.625	<b>0.002</b>	0.416	<b>0.006</b>
Umidade (%)	0.387	<b>0.031</b>	0.212	0.245	-0.072	0.806	0.111	0.631	0.127	0.425

r = Correlação de Pearson; p = p-value.

Na província de Maputo, verificou-se uma correlação positiva estatisticamente significativa entre detecção de enterovirus, umidade (p=0,031) e precipitação (p=0,028) (Figura 4.3).

Para a província de Nampula, constatou-se que o aumento dos parâmetros (umidade, precipitação e temperatura) a maior frequência da infecção por enterovirus, apesar de não ser estatisticamente significativo (Figura 4.4).

Para Sofala, observou-se uma relação inversa enquanto os parâmetros diminuía (umidade, precipitação e temperatura), o número de casos positivos aumentava, porém não foi estatisticamente significativa (Figura 4.5). Para Zambézia, houve correlação positiva entre detecção de enterovirus e temperatura (p=0,002) (Figura 4.6).

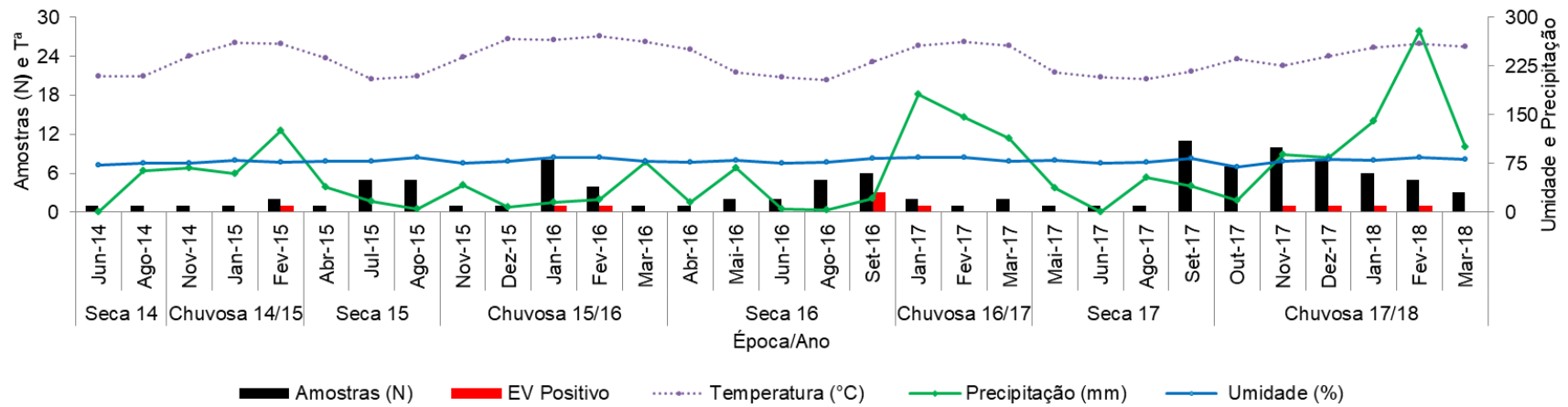


Figura 4.3. Distribuição temporal dos enterovírus e fatores ambientais na província de Maputo.

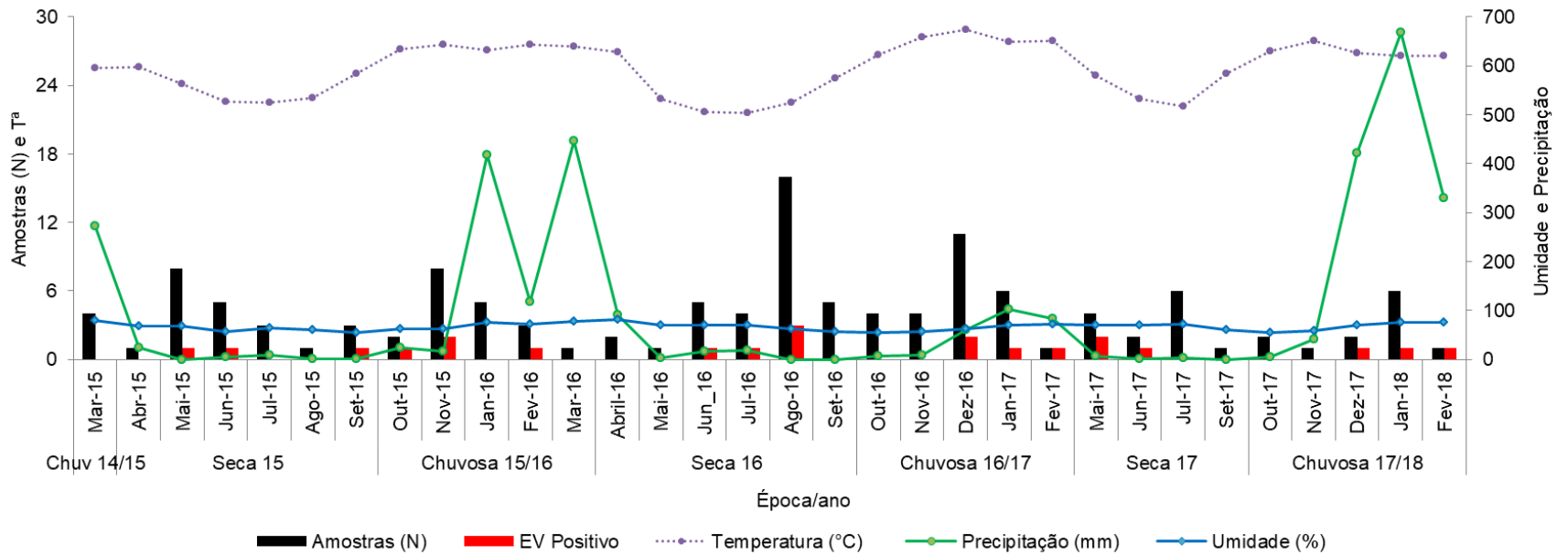


Figura 4.4. Distribuição temporal dos enterovírus e fatores ambientais na província de Nampula.

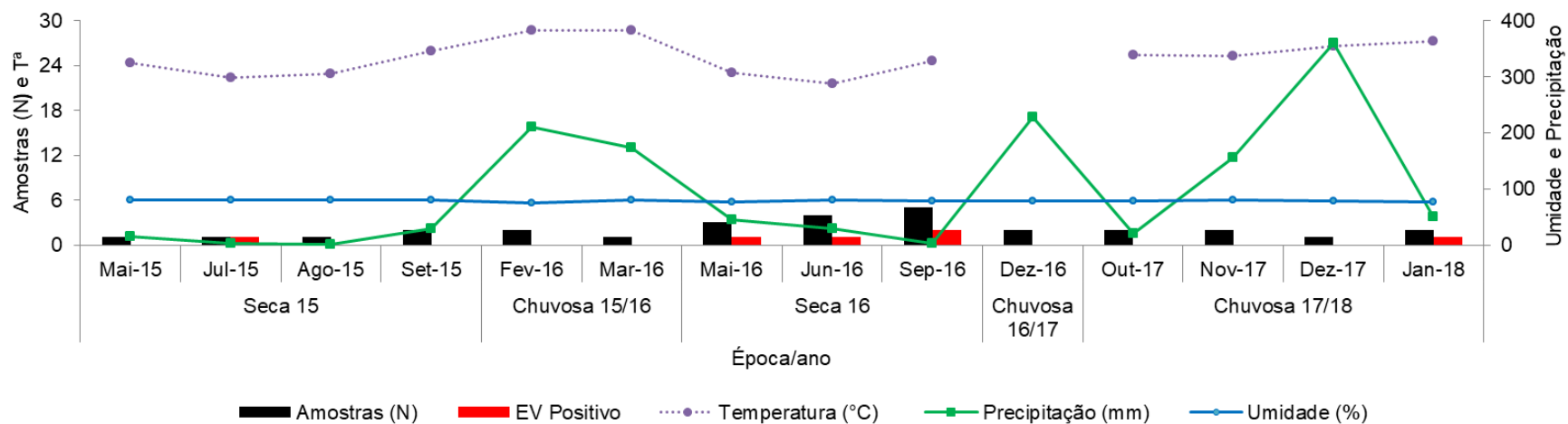


Figura 4. 5. Distribuição temporal dos enterovírus e fatores ambientais na província de Sofala.

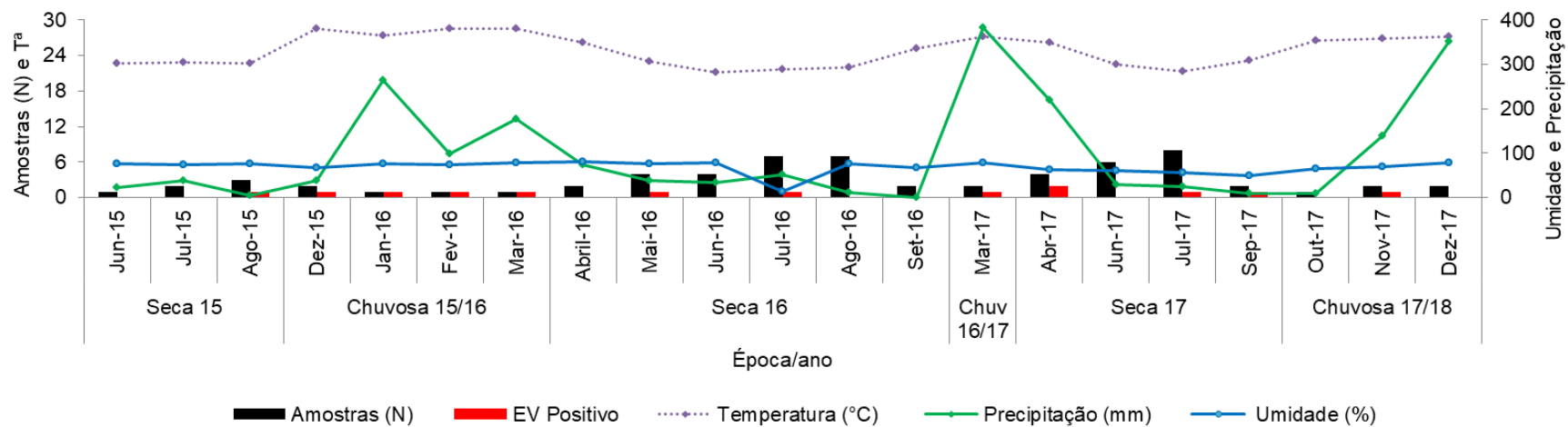


Figura 4.6. Distribuição temporal dos enterovírus e fatores ambientais na província de Zambézia.

#### 4.1.5. Enterovírus identificados e co-deteccção em crianças com doença diarreica

A caracterização molecular dos enterovírus revelou a presença de três espécies de *Enterovírus* (A, B e C). A espécie *Enterovírus B* foi a mais prevalente (40,4%, 21/52), seguida de *Enterovírus C* (32,7%, 17/52) e *Enterovírus A* (26,9%, 14/52). O sequenciamento parcial do gene VP1 demonstrou a presença de 26 tipos de enterovírus.

Estes tipos virais na sua maioria foram identificados a partir da linhagem celular RD com 44,2% (23/52), seguida por identificação direta da amostra com 34,6% (18/52) e por último a linhagem celular HEP2C com 21,2% (11/52), respetivamente.

Na espécie *Enterovírus A*, foram caracterizados cinco tipos virais, sendo o EV-A119 o mais prevalente (64,3%, [9/14]), seguido do CVA16 (14,4%, [2/14]), conforme demonstrado na Figura 4.7. Três tipos foram identificados apenas uma vez (7,1%) durante o período de estudo: CVA19, EV-A76 e CVA10.

Na espécie *Enterovírus B* (Figura 4.7), 14 tipos virais foram caracterizados. Os tipos mais frequentes foram E13 e EV-B75 (14,15%, [3/21]), detectados em isolados de 2016 e 2017, seguidas de E7, E11 e E14 (9,5%, [2/21] para cada), detectados durante o período de 2015 a 2018. Os demais nove tipos (CVB3, CVB5, E1, E14, E20, E21, E30, EV-B74 e EV-B97) foram detectados apenas uma vez (4,8%, [1/21]).

Para a espécie *Enterovírus C* (Figura 4.7), foram identificados sete tipos diferentes. O tipo mais frequente desta espécie foi o EV-C99 (47%, [8/17]), detectado durante o período de 2015 a 2017, seguido do CVA13 (23,5%, [4/17]), de isolados coletados em 2016. Os isolados CVA1, CVA11, CVA20, CVA24 e EV-C113, respetivamente foram detectados apenas uma vez (5,9%, [1/17]).

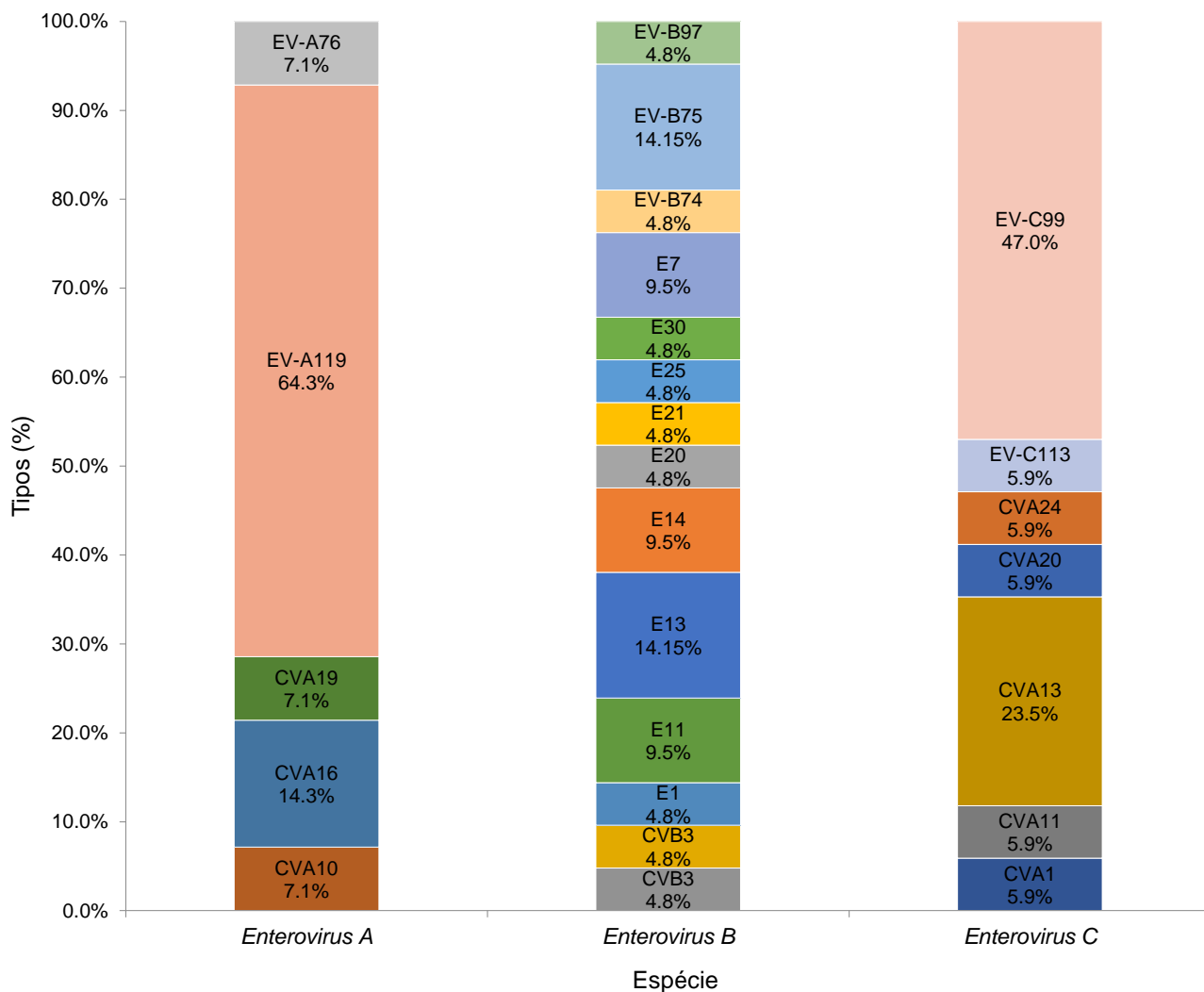


Figura 4.7. Diagrama ilustrando a percentagem de tipos por espécie de enterovírus detectados nas amostras clínicas.

Os enterovírus foram detectados durante os anos de 2015 a 2018, sendo as espécies *Enterovírus A* e *B* identificadas durante os quatro anos, e as amostras positivas na sua maioria foram detectados nos anos de 2016 e 2017 (Figura 4.8).

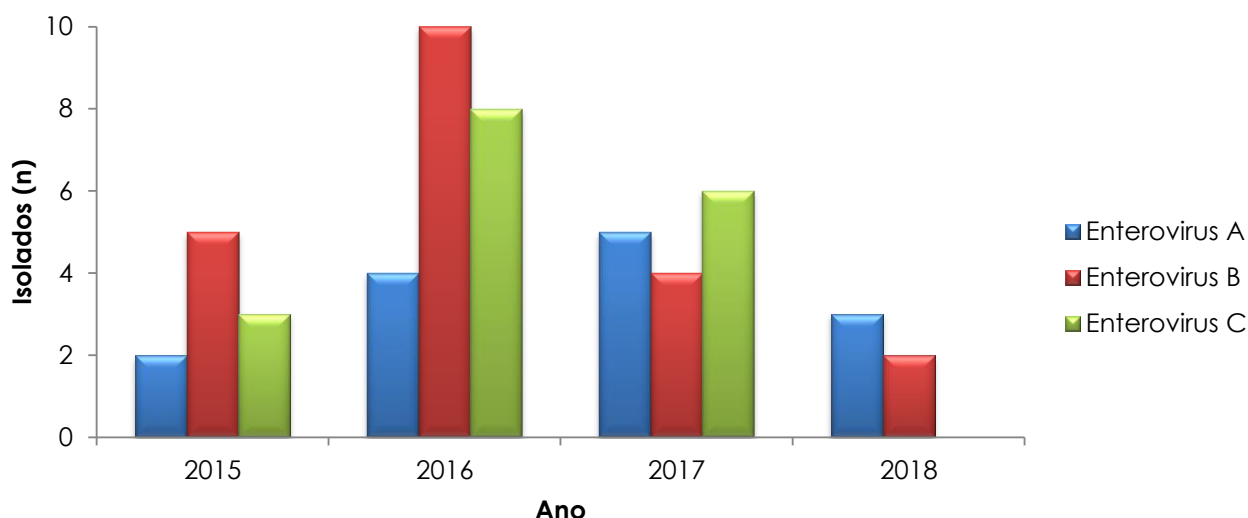


Figura 4.8. Espécies dos enterovírus identificados por ano.

A província de Nampula apresentou maior diversidade (14 tipos), seguida de Maputo e Zambézia com 10 cada. Em Maputo e Nampula foram detectadas amostras positivas durante todos os anos e o EV-A119 foi identificado em todos os anos (Quadro 4.1).

Quadro 4.1 Distribuição temporal por província e espécies dos isolados

Ano	Província	Espécies e tipos		
		<i>Enterovírus A</i>	<i>Enterovírus B</i>	<i>Enterovírus C</i>
2014	-	-	-	-
2015	Maputo	-	E20	-
	Nampula	CVA16	E7, E25, E30	EV-C99(2)
	Sofala	EV-A119	-	-
	Zambézia	CVA19, CVB3	-	-
2016	Maputo	-	CVB5, E14, E21, EV-B74, EV-B75	-
	Nampula	-	E7, EV-B75, EV-B97	EV-C99(2), CVA13(2), CVA24
	Sofala	EV-A119	-	EV-C99, EV-C113, CVA13
	Zambézia	EV-A76, CVA16	E13(2)	-
2017	Maputo	EV-A119	EV-C99, CVA11	-
	Nampula	EV-A119	E11, E13	EV-C99, CVA1, CVA20
	Zambézia	EV-119(2), CVA10	E14, EV-B75	CVA13
	Sofala	-	-	-
2018	Maputo	EV-A119	E1	-
	Nampula	EV-A119	E11	-
	Sofala	EV-A119	-	-
	Zambézia	-	-	-

Legenda: E= echovirus, EV = enterovírus, CV = coxsackievirus.

A co-deteccção entre enterovírus e outros agentes foi verificada em 17,3% (09/52), com maior frequência na espécie *Enterovírus B* (66,6%, 6/9) (Figura 4.9). Cerca de 44,4% (4/9) dos casos apresentaram gravidade severa e foram resultantes da combinação com rotavírus, *E. coli* e *Vibrio cholerae*. A maioria das co-deteccção foi detectada em crianças na faixa etária dos 10 a 36 meses (66,7%).

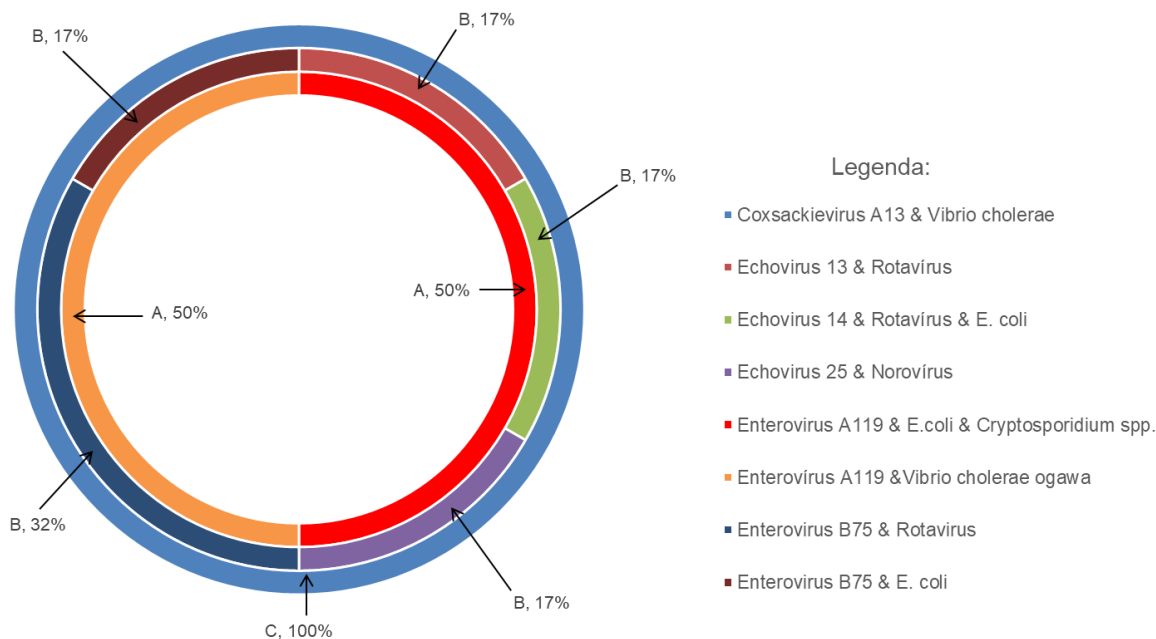


Figura 4.9. Co-deteccção entre enterovírus e outros agentes patogênicos. O diagrama ilustra três níveis correspondentes às três espécies de enterovírus: *Enterovírus A* (linha interna, duas co-deteccções), *Enterovírus B* (linha intermediária, cinco co-deteccções) e *Enterovírus C* (linha externa, uma co-deteccção).

#### 4.1.6. Análise filogenética dos enterovírus isolados nas amostras fecais

As análises filogenéticas das sequências nucleotídicas parciais da VP1 de isolados de enterovírus pertencentes às espécies *Enterovirus A*, B e C detectados em casos de doença diarreica estão apresentados nas Figuras 4.10, 4.11 e 4.12, respetivamente.

A análise filogenética da espécie *Enterovirus A* (Figura 4.10) sugeriu que os isolados EV-A119 estiveram geneticamente relacionados às sequências dos tipos identificados na África do Sul em 2015 em amostras ambientais. Em relação ao CVA10, a análise filogenética indicou claras relações genéticas com tipos isolados na Geórgia entre 2002 e 2003.



O tipo CVA16 mostrou-se relações filogenéticas com isolados reportados na França entre 2012 a 2014.

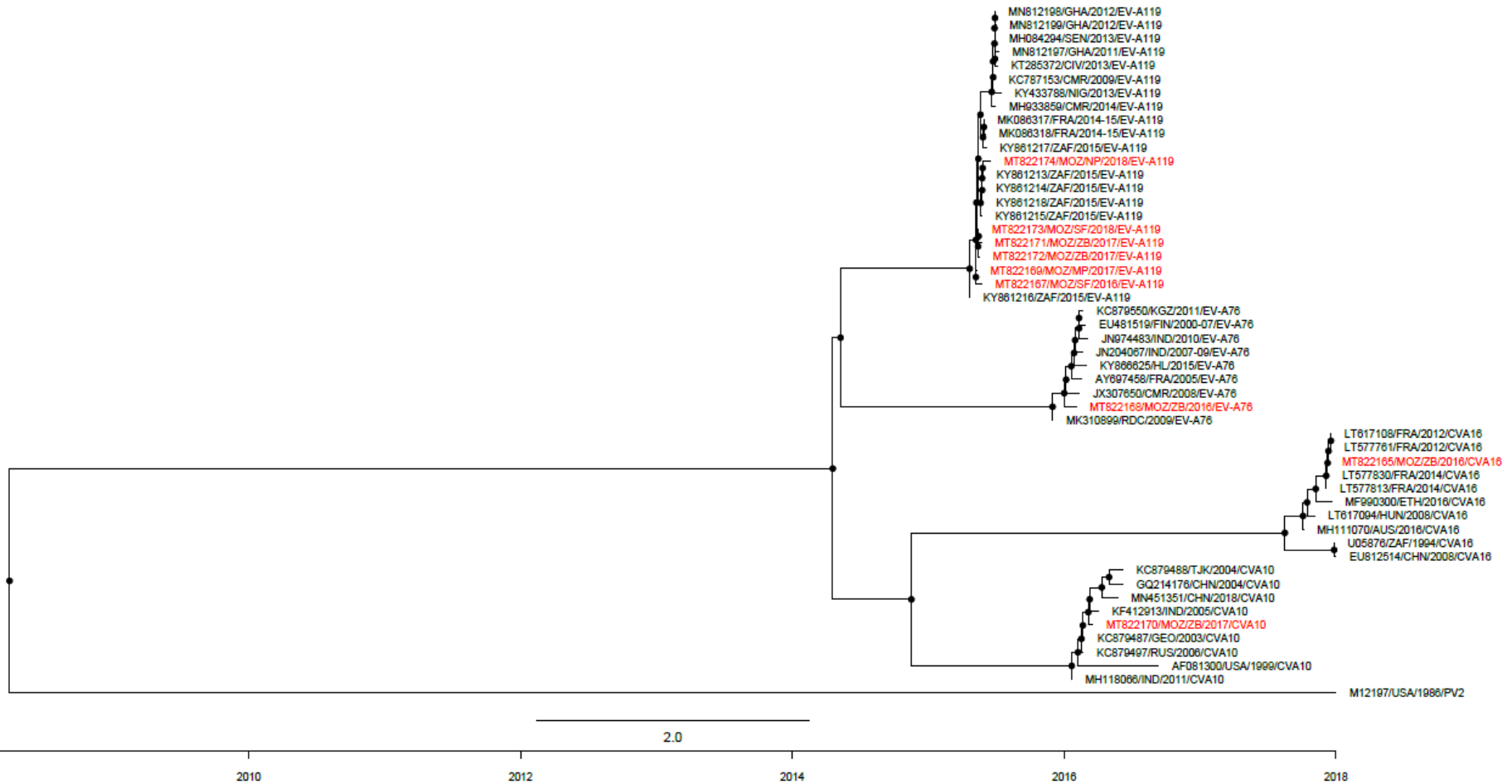


Figura 4.10. Reconstrução filogenética de enterovírus espécie A. Com base na sequência parcial de VP1 (pb) de isolados de Moçambique, no período 2014-2018. A cor vermelha mostra os tipos virais deste estudo.

Na análise filogenética da espécie Enterovirus B (Figura 4.11), o EV-B75 revelou-se filogeneticamente similar aos isolado de amostra ambiental de Moçambique e isolado de casos de PFA de Filândia entre 2000-2008.

O isolado E11 mostrou-se geneticamente relacionado a cepas descritas na RDC (2013), e outros isolados de amostras ambientais de Moçambique (2018).

O tipo EV-B97 evidenciou relações filogenéticas a isolados que circularam em 1999 no Bangladesh e China em 2010 respetivamente.

Em relação ao E14 este isolado revelou-se similar a outros que circularam na RDC (2008), enquanto o CV-B5 foi filogeneticamente similar ao reportado na Itália e Austrália, em 2017.

O E1 mostrou-se filogeneticamente similar ao isoaldo de 2010 da RDC. Por seu turno o E13 foi geneticamente similar ao tipo que circulou entre 1999-200em 2014 no Senegal. Por seu turno, o E20 foi similar ao tipo viral que circulou entre 1997 a 2006 na República Centro Africana.

Analises do tipo E21 evidenciou-se geneticamente similar ao vírus que circulou entre 1999-2002 nos Estados Unidos. O E25 foi similar ao isolado de China (2005) e Japão (2013). O isolado E30 mostrou-se semelhante ao tipo viral que ciruclou em 2017 no Brasil.

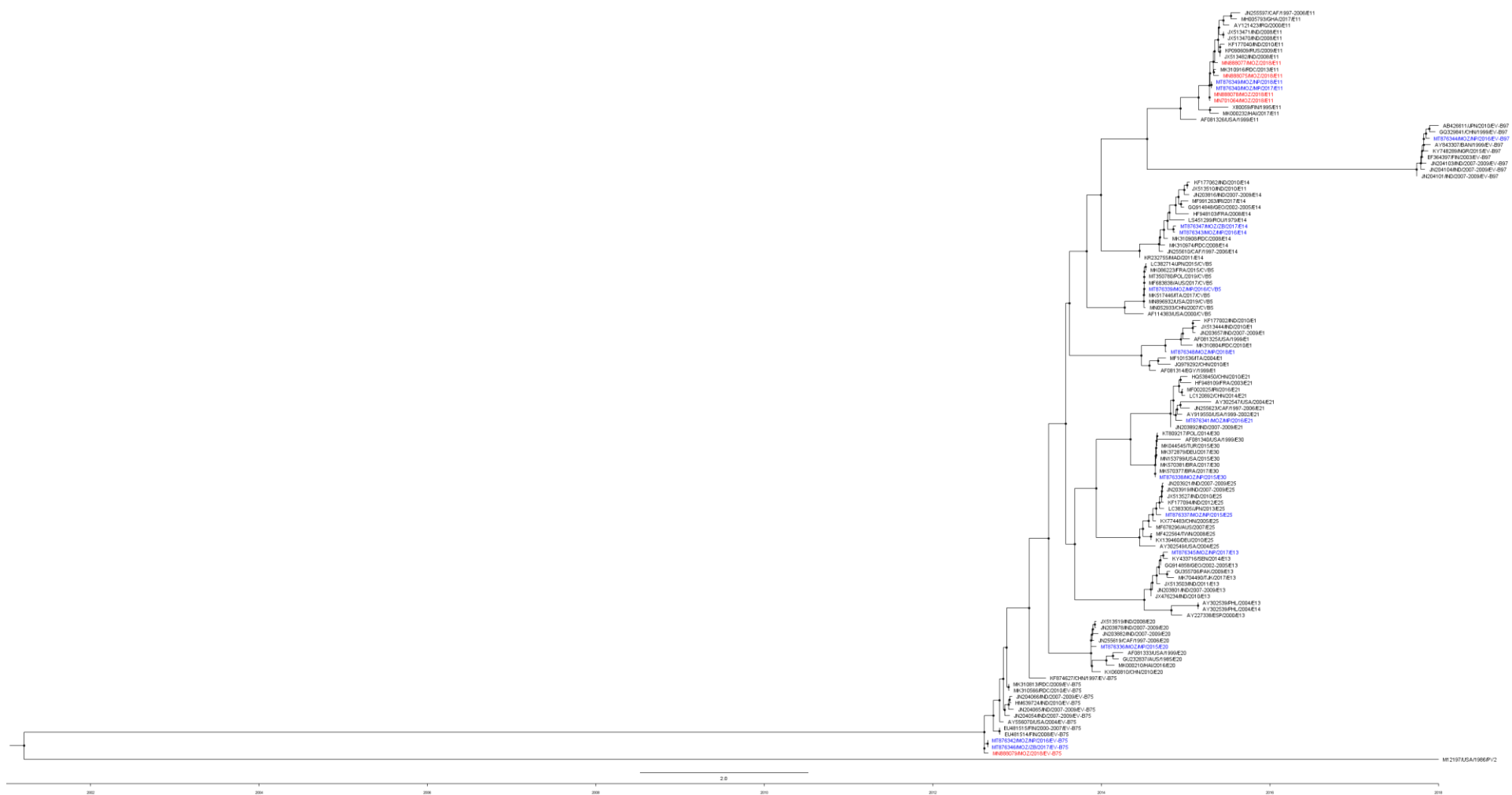


Figura 4.11. Reconstrução filogenética de enterovírus espécie B. Com base na sequência parcial de VP1 (pb) de isolados de Moçambique, no período 2014 - 2018. A cor azul mostram os tipos virais de casos de diarreia e cor vermelha água de esgoto.

Pela análise filogenética da espécie *Enterovirus C* (Figura 4.12), o tipo CVA13 mostrou a existência de três grupos distintos relacionados aos isolados identificados na República Centro Africano (1997-2006), Malauí (2004), segundo grupo com isolados da RDC (2013) e Malauí (2004), e terceiro grupo composto por isolados da África do Sul em 2015.

Os isolados de EV-C99 mostraram uma similaridade genética com os isolados de 2004 de Malauí. O EV-C113 revelou uma relação genética próxima com isolados relatados em Gana em 2012.

O isolado CVA1 mostrou relações genéticas com isolados relatados em Holanda (2014). O CVA24 deste estudo evidenciou-se similar a isolado da Rússia (2001). O tipo viral CVA19 foi filogeneticamente similar ao isolado da França (2014).

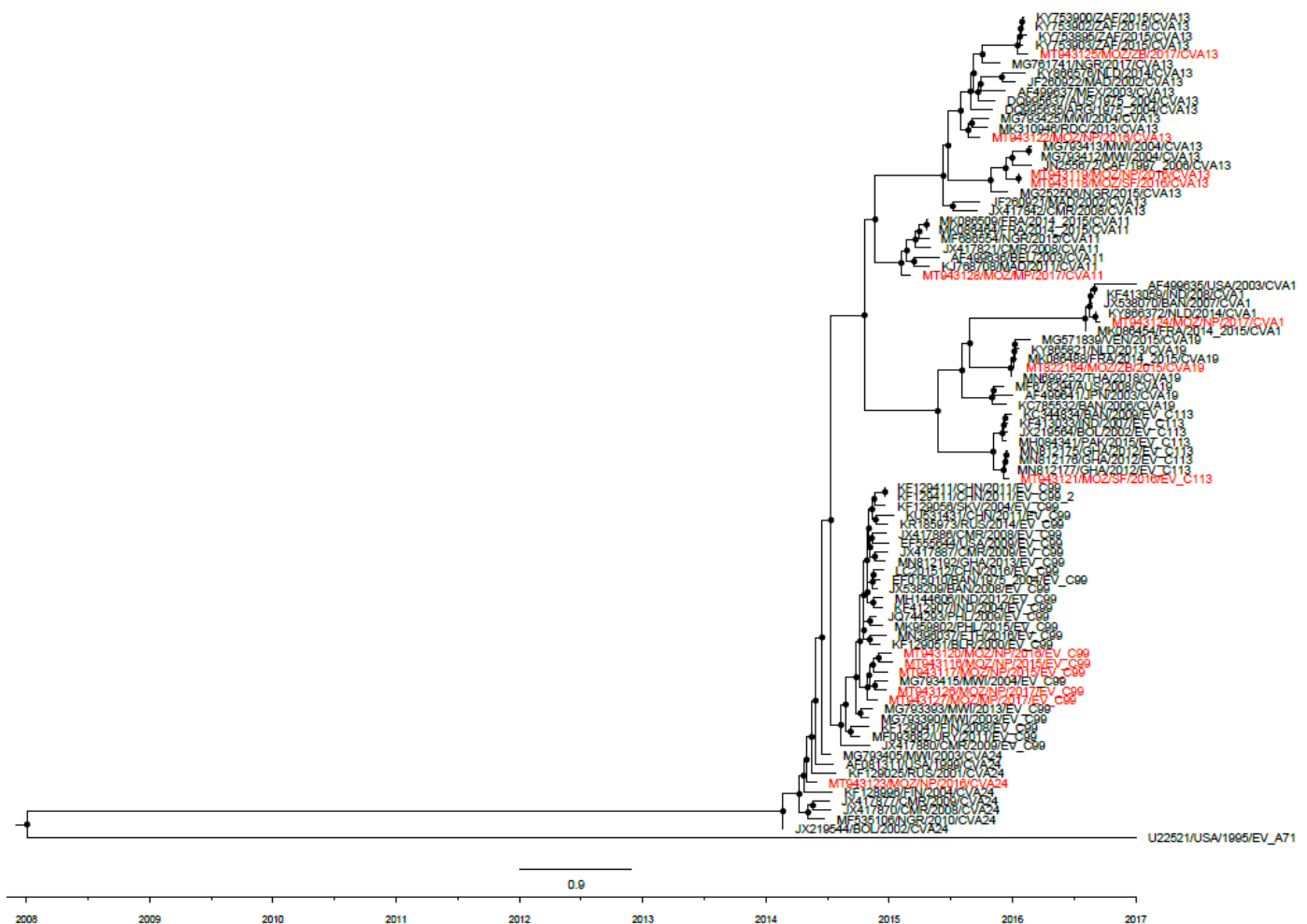


Figura 4.12. Reconstrução filogenética de enterovírus espécie C. Com base na sequência parcial de VP1 (pb) de isolados de Moçambique, no período 2014 -2018. A cor vermelha ilustra as amostras deste estudo.

## 4.2. Estudo Ambiental

Sessenta e três amostras de esgoto foram coletadas entre janeiro e novembro de 2018 em três pontos da cidade de Maputo (ETAR e Avenidas Marginal e 10 de Novembro). Destas, 39,7% (25/63) apresentaram efeito citopático, 24 somente na linhagem RD e 1 nas duas linhagens (RD e L20B), como mostra a tabela 4.6. Foi realizada uma testagem direta a partir da amostra concentrada por qRT-PCR, onde apenas uma amostra mostrou-se positiva (1,6%; [1/63]) posteriormente identificada como CVB5.

Tabela 4.6. Isolamento viral de amostras ambientais

Linhagens celulares	Nº. de amostras isoladas/ Nº de amostras testadas (%)
RD	24/63 (38,1)
RD + L20B	1/63 (1,6)
Total	25/63 (39,7)

A caracterização molecular por sequenciamento demonstrou a circulação de duas espécies de enterovírus: *Enterovírus B* e *C*. Na espécie B, foi possível identificar os seguintes tipos: CVB3 (36%; [9/25]), E11 (28%; [7/25]), CVB5 (12%; [3/25]), E7 (12%; [3/25]), E6 (4%; [1/25]) e EV-B75 (4%; [1/25]).

Na espécie C, somente um PV1 vacinal foi identificado (4%, 1/25). O vírus apresentou uma troca de base ao longo do gene VP1, no resíduo A316 (A → G).

Com relação à distribuição pelos pontos de coleta das amostras, todos os pontos apresentaram amostras positivas (Tabela 4.6). O local que apresentou o maior número de isolados foi a ETAR [13 isolados], seguido da Avenida Marginal [9 isolados] e Avenida 10 de Novembro [3 isolados].

Os enterovírus foram detectados em todos de meses da coleta. O mês de março foi o que apresentou maior número de isolados (n=3) (Tabela 4.7).

Tabela 4.7. Enterovirus identificados por local de coleta nas amostras ambientais

Mês	Local de coleta		
	Av. 10 de Novembro	Av Marginal	ETAR
Janeiro		CVB5	CVB5, E7
Fevereiro			PV1
Março	CVB5	EV-B75	E11
Abril	E11		E7
Maio	E11, E11	E11	
Junho			CVB3
Julho			CVB3, E6
Agosto	E11		CVB3
Setembro		CVB3	CVB3, E27
Outubro		CVB3, CVB3	E11
Novembro		CVB3	CVB3

ETAR= Estação de Tratamento de Águas de Residuais do Influyente, CVB5= Coxsackievirus B5, CVB3= Coxsackievirus B3, EV-B75= Enterovírus B75, E7= Echovirus 7, E11= Echovirus 11, E6= Echovirus 6, PV1= Poliovírus1.

Não foi observado padrão sazonal para épocas chuvosa e seca (Figura 4.13). Entretanto, verificou-se um aumento do número de isolados com o aumento da precipitação ( $p=0.737$ ) e da temperatura ( $p=0.770$ ), porém não foi estatisticamente significativo. Entretanto, o número de isolados de enterovírus aumentou quando a umidade ( $p=0.516$ ) diminuiu, apesar de não ser estatisticamente significativo.

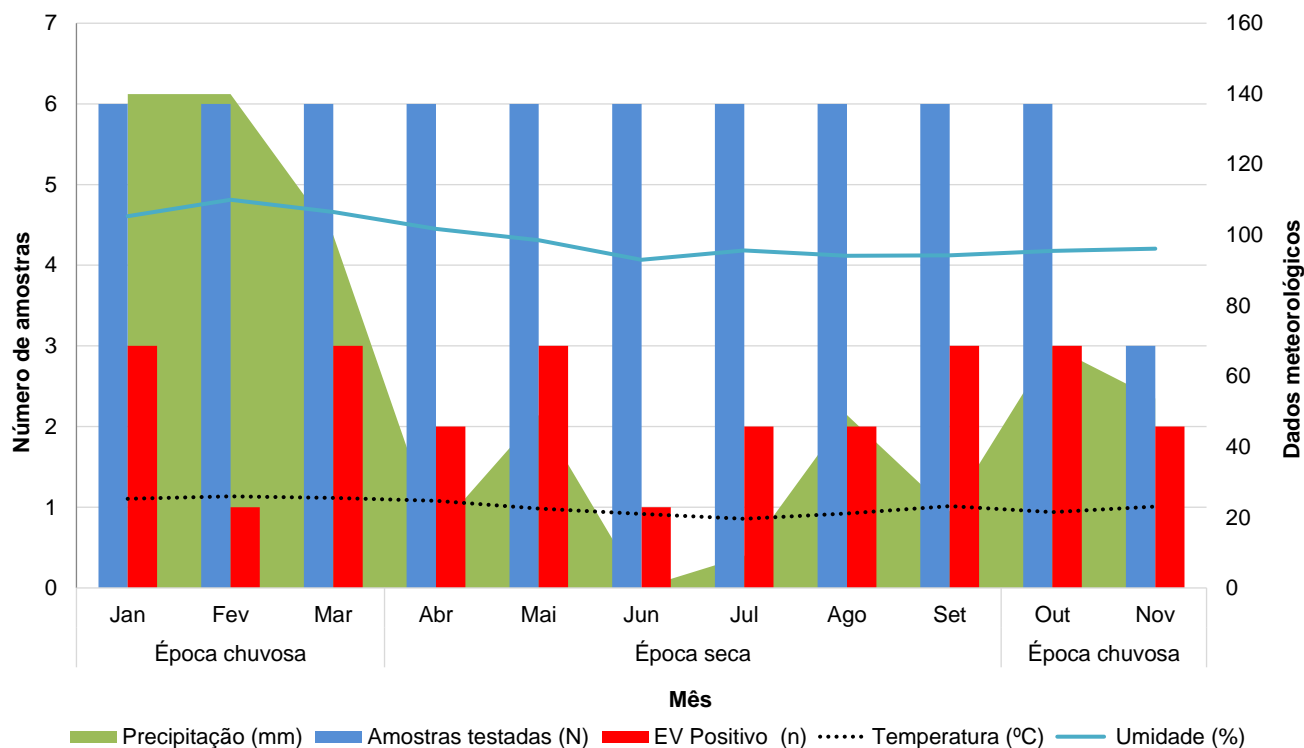


Figura 4.13. Distribuição temporal dos enterovírus isolados em amostras ambientais, segundo variações meteorológicas, na cidade de Maputo em 2018.

Análises filogenéticas baseadas na sequência parcial do gene que codifica para a VP1 dos isolados de esgoto Moçambique revelaram diversidade genética entre os tipos (Figura 4.14). O isolado CVB3 mostrou grande similaridade genética com isolados reportados no Japão em 2015.

Os isolados de E11 formaram dois grupos distintos com isolados da RDC e África do Sul, entre isoaldos de 2010 a 2015 e o CVB5 identificado mostrou-se geneticamente relacionado com o reportado China em 2018.

O E7 apresentou grupos distintos, primeiro relacionado a isolados do Senegal de 2013, segundo mostrou relações filogenéticas com tipos virais de Nigeria (2014) e o terceiro grupo com isolados da República da Africa do Sul (2016).

O EV-B75 apresentou relações filogenéticas próximas a isolados reportados na Filândia em 2008. Enquanto que o E6 mostrou-se geneticamente similar a isolados da Rússia (2012).

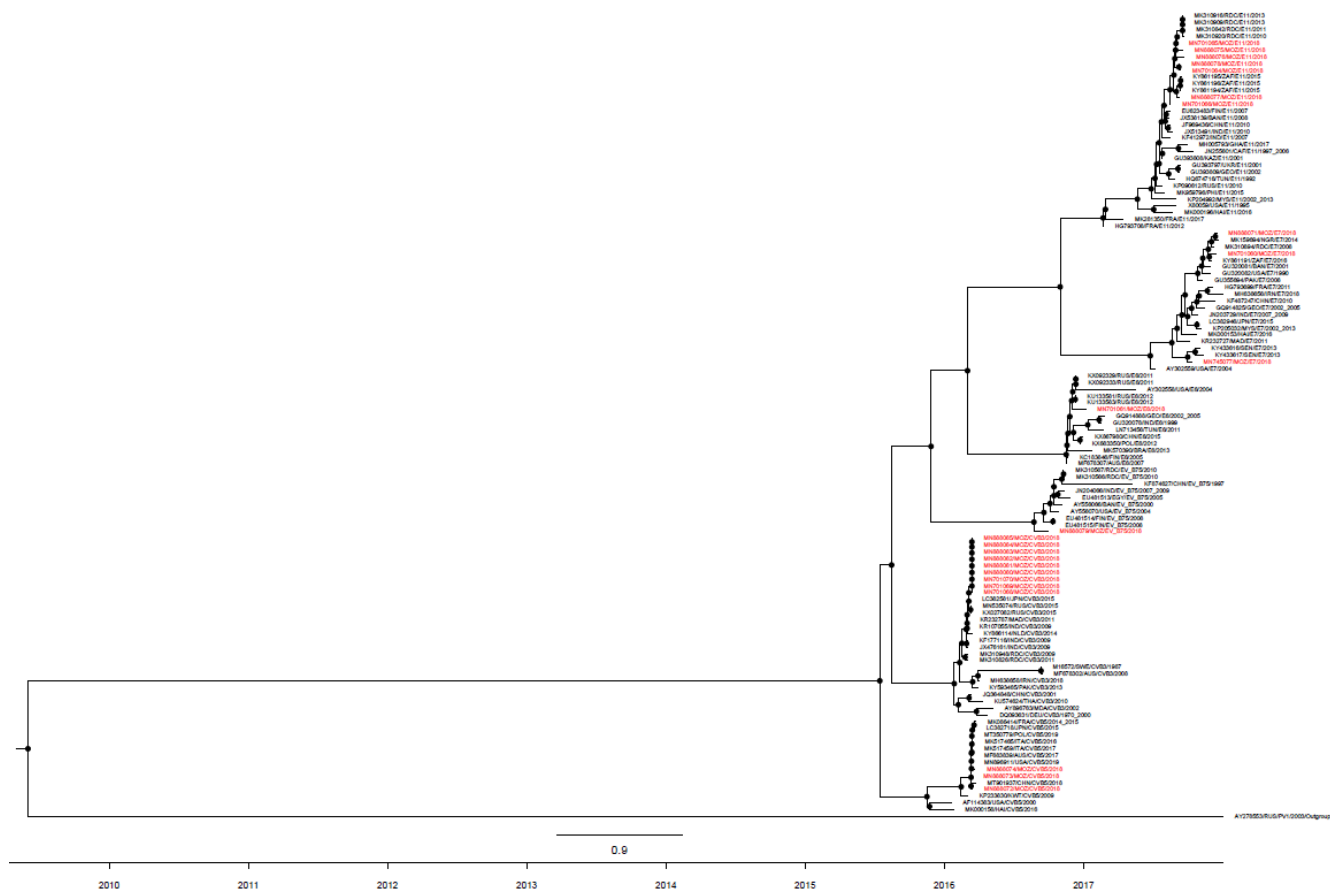


Figura 4.14. Análise filogenética dos Enterovírus B isolados em amostras de água de esgoto da cidade de Maputo em Moçambique. Esta análise envolveu 66 sequências nucleotídicas de 291pb do gene que codifica a proteína. VP1. O número de acesso ao GenBank, país de origem, tipo de amostra/isolado, e ano de coleta estão indicados em cada sequência referida. A cor vermelha mostra os tipos virais isolados neste estudo.

Quando se comparou os tipos virais detectados nas amostras de esgoto de 2018 e os isolados de amostras clínicas na cidade de Maputo, constatou-se que são tipos diferentes, apesar de alguns tipos virais terem sido isolados em período anterior a 2018 tenham sido identificados em amostras ambientais como é o caso do CVB5 e EV-B75.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo de casos de diarreia

O estudo global multicêntrico de diarreia (GEMS) identificou o rotavírus como principal agente etiológico da doença diarreica na África Subsaariana e no Sudoeste Asiático (87). Em Moçambique, abordagem dos trabalhos tem sido o rotavírus como principal agente etiológico da GA (79,87,99).

A ocorrência de enterovírus já foi relatada em doenças diarreicas em alguns países, incluindo Brasil, Estados Unidos de América, Gana, Índia, Suíça e Vietnã (13,14,23–25,61,83,100). No entanto, na África Subsaariana os dados são escassos, tendo sido constatado apenas um estudo em Gana de 2008 (24).

A diferença do presente estudo consiste na descrição da epidemiologia e clínica da infecção por enterovírus em amostras previamente testadas para rotavírus e outros agentes, mostrando que os enterovírus são detectados em uma proporção significativa em crianças com diarreia.

A frequência de enterovírus no estudo foi de 15,9%, percentual aproximado aos 14 a 16,6% obtidos em estudos conduzidos entre 2004 e 2012 na Índia (14,23,25).

A prevalência de casos positivos de enterovírus foram maiores em crianças do sexo feminino como reportado previamente por Dechkum (1998) na Tailândia e Phan (2005) e no Vietnam (43,83). Contudo, isto pode ocorrer devido à resposta imunológica perante a exposição a um determinado agente biológico como descrito por Klein (2010) e Torcia (2012) (44,45).

Em relação à faixa etária, verificou-se maior número de crianças positivas entre 12 a 23 meses de idade, similar ao reportado por Coutinho (2019) no Brasil (101). A maior detecção nesta faixa etária pode estar associada ao comportamento característico dessa idade, como levar objetos à boca e possuir alimentação diversificada, o que proporciona uma maior exposição ao patógeno, como sugerido por Coutinho (2019) (101).

O grupo de participantes que consumia água não potável apresentou maior frequência de detecção de enterovírus, o que pode estar associado à forma de transmissão fecal-oral desses agentes. Casos de infecção por EV de veiculação hídrica foram relatados em Equador e Nepal (102,103).

A idade das cuidadoras mais novas apresentou-se como um fator protetor, quando comparado com as de idade igual ou superior aos 35 anos. Muitas mães nesta faixa etária

prestam pouca atenção e cuidados as crianças quando comparadas as mães mais novas, como reportado por Bachrach (2002), Kang (2009), Levy (2012) e Okour (2012) (103–106).

O estado civil casado foi um fator de risco maior de infecção para as crianças, segundo Thiam (2017) e Mekonnen (2018), isto pode dever-se a pouca atenção ou atenção dividida com outras atividades domésticas (107,108).

As crianças cuidadas por mães sem educação formal apresentaram um risco maior de infecção, o que pode estar associado ao baixo conhecimento de medidas de prevenção, tratamento de água ou manuseio em casos de diarreia, como previamente reportado na Índia, Jamaica e Senegal (106,107,109).

As crianças que moram em condições de habitação precárias apresentaram maior risco de infecção, pois instalações de habitação, com saneamento básico precário podem contribuir para maior transmissão de patógenos entéricos de transmissão fecal-oral, como descrito por Powell (1984), CDC (2018) e MISAU (2018) (9,40,46).

Nos nossos achados, não verificamos associação entre detecção e o número de componentes familiares, como reportados no Equador, Índia e Jordânia (103–105). Condições de saneamento básico, falta de água potável e de habitação precária podem propiciar maior risco de infecção (9,40,104,105).

As crianças HIV positivas apresentaram maior prevalência de infecção por enterovírus, o que pode estar associado a diversos fatores, como resposta imune comprometida, um fator de risco crucial para o desenvolvimento de diarreia moderada a severa em crianças, como previamente reportado por Souzinho (2018) no distrito de Manhica, na região sul de Moçambique (110).

O facto do número de casos de enterovirus ter aumentado após a introdução da vacina contra o rotavírus no país, pode ser justificado pela pressão vacinal na redução da frequência do rotavírus, como reportado em Moçambique por de Deus (2018) (79).

Os achados deste estudo revelaram uma relação inversa entre positividade do enterovírus em amostras de fezes negativas para rotavírus (18.5% vs. 5.9%) e outros patógenos entéricos (22.8% vs. 6.5%) principalmente após a introdução da vacina contra rotavírus. Vale ressaltar que, depois da sua introdução em Moçambique verificou-se a redução da frequência de infecção por rotavírus, como verificado por de Deus (2018) (79). Dados semelhantes também foram relatados por Patil na Índia (2014) em surtos de

gastroenterite aguda, reforçando a associação dos enterovírus com a doença diarreica e sua relevância nesse cenário pós-vacinal (23).

No que diz respeito ao Ct das amostras positivas aos enterovírus, entre os períodos pré e pós-vacinal, constatou-se que na fase pré um valor baixo, sugerindo uma maior quantidade de partículas virais libertos em infectados quando comparado a fase pós vacinal.

O quadro de doença diarreica nos casos positivos para enterovírus apresentou-se como grave segundo escala e Ruuska e Vesikari, em contraste ao reportado em estudo conduzido na Índia por Patil (2014), onde a gravidade foi moderada. Isto pode estar relacionado ao estado imunológico das crianças (23).

A infecção por enterovírus foi mais frequente e grave na faixa etária dos 12-23 meses, ao passo que na infecção por rotavírus foi faixa etária dos 0-11 meses, foi a mais afetada conforme reportado na literatura por Kotloff (2013) e de Deus (2018) (79,87).

Os parâmetros clínicos como febre, vômito, olhos encovados, letargia e prega cutânea não mostraram associação com a detecção dos enterovírus em crianças participantes do estudo. O mesmo foi observado em estudo realizado na Índia por Patil (2014), com exceção da desidratação. Isto pode ter ocorrido pelo fato de todas as crianças do estudo terem se apresentado no hospital com um quadro grave. Neste estudo, foi observada co-detecção entre enterovírus e outros agentes entéricos, conforme já descrito na Índia por Patil (2014) Rao (2013) e Suíça por Gosert (2018) (14,23,61).

Apesar de não existir diferença estatisticamente significativa entre as épocas do ano, observou-se maior frequência de casos de enterovírus positivos na época chuvosa, o que pode ser devido à inundações ou cheias, aglomeração, confinamento das pessoas devido a chuva. Este padrão não evidente é característico de países que possuem um clima tropical como é o caso de Moçambique, assim como foi descrito previamente por Ndiaye (2014) e Delogu (2018) (39,48).

Em relação aos fatores climáticos, observou-se correlação positiva entre temperatura e detecção viral. Isto pode estar associado ao fato da temperatura facilitar a dispersão e propagação do vírus, como demonstrado antes na China e Estados Unidos de América (47,111). Por outro lado, o padrão de distribuição dos vírus pelas províncias nas três regiões do país foi diferente, apresentando maior risco para Sofala e Zambézia, o que sugere que a distribuição geográfica associada a fatores climáticos, pode ter um papel na ocorrência de

enterovírus como previamente ilustrado (39,88,112). Entretanto, há necessidade de realizar mais estudos para avaliar estes parâmetros.

Um dado importante neste estudo foi à identificação de tipos não comuns de enterovírus em casos de doença diarreica, como: EV-B75, EV-B97, EV-C113, EV-A119. A espécie *Enterovírus B* foi a mais identificada, assim como observado na Índia e Tailândia. Isto pode ter ocorrido pelo uso da linhagem celular RD utilizada, uma vez esta espécie replica facilmente nesta célula (11,22,23).

Os isolados foram pertencentes às espécies *Enterovírus A* a *C*. A espécie *Enterovírus D* não foi identificada, que pode ser justificado pela falta da proteína de codificação na região 5' NC o genoma (uORF) do vírus que é importante na infecção das células epiteliais do intestino (31).

A maior frequência de EV-C99 e EV-A119, são diferentes dos achados dos autores em quadros de diarreia (14,23), o que pode ser devido ao uso de metodologias diferentes para a detecção e identificação viral (23).

O presente estudo mostrou alta diversidade de enterovírus em Moçambique, muitos sorotipos circulantes a cada ano e diferentes sorotipos predominantes em anos diferentes. Entretanto, os fatores de suas dinâmicas geográfica e temporal ainda não são compreendidos, o que demonstra a capacidade dos enterovírus se espalharem por grandes áreas geográficas e destaca a importância o monitoramento contínuo dos enterovírus em todo o mundo incluindo em Moçambique (47,113).

Estes achados constituem primeiro passo para uma melhor compreensão dos fatores determinantes de sua dinâmica de transmissão, padrões epidêmicos espaciais e temporais associados a fatores climáticos em casos de GA.

As relações filogenéticas dos vários tipos de enterovírus identificados em Moçambique com outros de regiões geográficas, demonstra a capacidade das linhagens de enterovírus se espalharem por grandes áreas geográficas e destaca a importância da vigilância de enterovírus em todo o mundo. No entanto, devido a lacunas substanciais na vigilância atualmente existente em alguns países e à natureza assintomática da infecção por enterovírus é difícil identificar as origens geográficas precisas dos tipos virais (113).

Com relação à análise filogenética, para a espécie *Enterovírus A*, os isolados EV-A119 de Moçambique indicaram a existência de dois grupos diferentes. Ambos os grupos estão intimamente relacionados a tipos isolados em amostra de esgotos de 2015 na África

do Sul, o que sugere que estes vírus tenham sido importados destes países vizinho, uma vez que estes países compartilham fronteira.

A análise filogenética do CVA16 isolado de Moçambique em 2015 mostrou que era geneticamente semelhante isolados de boca e garganta na França entre 2012 e 2014, o que sugere que a globalização ou viagens internacionais pode permitir a disseminação do vírus em várias partes do mundo em curto espaço de tempo (38,112).

O isolado CVA10 de Moçambique de 2017 apresentou-se geneticamente relacionados a outros isolados detectados na Índia entre 2005 em casos de gastroenterite aguda, sugerindo a circulação mundial desses vírus, tendo iniciado no sudoeste asiático, seguido da detecção na Índia e em época similar do isolado na amostra deste estudo (23).

O tipo EV-A76 isolado em Moçambique, foi filogeneticamente similar ao sorotipo que circulou entre 2008 e 2009 na República Centro Africana (114).

Dos 21 tipos da espécie *Enterovirus B*, os isolados do E11 mostraram-se geneticamente relacionados aos descritos em amostras ambientais em Moçambique em 2018, e isolados descritos em circulação na República Democrática do Congo (RDC) entre os anos 2010 e 2013, 2008-2009 respectivamente.

O isolado E14 reportado no estudo esteve geneticamente relacionado a isolado descritos em isolado da Roménia (de 1979) recentemente sequenciado no Instituto Pasteur de Paris (2019) no projeto cujo objetivo visa sequenciar todo o genoma de enterovírus humanos presentes em amostras contendo uma mistura de vírus (Accession: PRJEB26958 ID: 512706).

O EV-B97 identificado no estudo revelou-se geneticamente similar a isolado do Japão indivíduos saudáveis vindos de outros países asiáticos (115). Sugerindo de que estes vírus podem ser facilmente disseminados em outras áreas geográficas.

Por sua vez o CV-B5 isolado mostrou-se geneticamente relacionado a um tipo que foi relacionado a menigitas em vários países como Polónia, Austrália, Estados Unidos (entre 2017 e 2019) e que teria tido origem na China em 2007, sugerindo que pode ter evoluído e causado outro tipo de infecção nos outros locais, e isolado em amostras ambientais na Itália em 2017 (116).

Os isolados E21 do estudo, mostraram-se geneticamente relacionados ao isolado dos Estados Unidos, porveniente de casos suspeitos de PFA provenientes do Bangladesh entre os anos 1999 a 2002 (117).

O tipo viral E13 foi filogeneticamente similar ao reportado na República Centro Africana (2014), sugerindo que este vírus esteja a circular no oeste do continente Africano (118).

Um achado de destaque da tese foi a detecção do EV-B75, raramente isolado em amostras de fezes e esta similar ao isolado em amostras do ambiente. Este tipo mostrou-se presente nas três regiões do país, o que pressupõe sua circulação entre as comunidades, e está filogeneticamente relacionado a tipos associados a doenças neurotrópicas, como encefalites (Filândia) e em amostras ambientais no Egito em 2008 (119).

A análise filogenética da espécie *Enterovírus C*, evidenciou que o EV-C99 apresentou similaridade genotípica a três grupos distintos. A relação filogenética foi observada entre isolados do estudo com dois grupos relacionados aos casos de PFA de 1975 a 2012 em diferentes países (114,120–122).

No que se refere ao EV-C99, os isolados de Moçambique estavam intimamente relacionados com tipo de amostras de PFA coletadas no país vizinho (Malawi) em 2004 (123).

A análise filogenética do CV-A13 mostrou três agrupamentos com estreitas relações com tipos isolados a partir de amostras fecais no Malawi e RDC (2004 e 2013), África do Sul (2015) e República Centro Africana e Malawi entre 1997 a 2006 (123,124).

O isolado do estudo EV-C113 relatado apenas uma vez, mostrou-se intimamente relacionado a isolados de Gana, em indivíduos HIV negativos e positivos (125). Os isolados moçambicanos CVA1 e CVA24 apresentaram geneticamente semelhantes à isolados de amostras ambientais da Holanda e Rússia, respetivamente (122,126).

O estudo teve algumas limitações aconteceram durante o estudo. Como todas as crianças participantes encontravam-se internadas em hospital de referência, uma vez que apresentava uma condição de doença grave, isso não permitiu a avaliação da presença de enterovírus em casos leves ou moderados da doença. Além disso, a maior cobertura dos postos sentinelas utilizados foi em áreas urbanas em detrimento de áreas rurais, o que pode subestimar a doença nestes locais.

Em resumo, os enterovírus são um agente etiológico a considerar e com uma proporção significativa na doença diarreica, especialmente quando os resultados mostram-se negativos para outros agentes que causam diarreia. Tipos raros de enterovírus foram isolados neste estudo e a gravidade da doença é semelhante a outros patógenos entéricos.

## 5.2. Estudo ambiental

Este é o primeiro estudo de vigilância ambiental de enterovírus conduzido em Moçambique. A vigilância ambiental de poliovírus faz parte no Plano Estratégico da Iniciativa Global de Erradicação da Poliomielite, como um complemento à vigilância da Paralisia Flácida Aguda (PFA) (48,63). A VA é uma abordagem sensível para detectar diferentes tipos de PVs e ajuda a entender os padrões de circulação dos enterovírus em diferentes países (22,63), particularmente naqueles que apresentam um sistema de vigilância clínica frágil.

Como método de concentração, utilizou-se o dióxido de sílica que apresenta uma ótima capacidade de recuperação (70). A pesquisa dos enterovírus nas amostras de esgoto foi realizada através do isolamento em cultura de células usando linhagens RD e L20B, como recomendado pela OMS (22).

Durante este estudo, das 63 amostras rastreadas, a frequência dos enterovirus identificados foi de 39,7% (25/63) mostraram-se positivas. Resultados semelhantes foram obtidos em outras regiões, como Nigéria, Índia e África do Sul, que reportaram 34,6%, 40,4% e 42,5% (118,127,128), respetivamente. Percentuais superiores (70%) foram observados no como Brasil e Senegal (70%) (70,129).

Nossos achados mostraram que a maioria dos isolados pertencia à espécie *Enterovírus B*, dados que corroboram os estudos de Khetsuriani e colaboradores na Georgia (130) e Odoom e colaboradores em Gana (129).

Não foi isolado nenhum tipo da espécie *Enterovírus C* além do PV1 vacinal. Isto se justifica pela ausência do uso da linha celular HEp-2C no procedimento laboratorial. Não obstante, alguns estudos demonstraram que o uso de células HEp-2C aumentou o número de isolados de espécie C, revelando que a ausência dessa linhagem na rotina de isolamento pode levar a uma subestimação do isolamento (124,131).

Apenas o PV1 tipo Sabin, foi isolado e identificado no ambiente. Este poliovírus provavelmente foi excretado por indivíduos imunizados com a vacina oral contra o poliovírus, uma vez que Moçambique ainda usa a vacina oral no esquema de imunização. O baixo grau de mutação encontrado neste isolado do tipo Sabin sugere uma circulação limitada dos vírus na comunidade (39). Deve-se notar que nossas amostras foram coletadas antes do surto de VDPV que está em curso no continente africano (49).

Os fatores climáticos não mostraram correlação estatisticamente significativa com a positividade dos enterovírus. Estes foram isolados em todos os meses de coleta e nenhum

pico de distribuição foi evidente durante esse período, corroborando com o achado de que os padrões de sazonalidade são menos evidentes em áreas tropicais (15,48).

O EV-B75 foi isolado apenas uma vez neste estudo no mês de março. Curiosamente, a análise filogenética mostrou que esse isolado estava mais intimamente relacionado a isolados de amostras de fezes coletadas de casos de PFA na Finlândia (119). Este tipo é relatado e associado a casos de PFA e não é encontrado frequentemente em amostras ambientais (119,127). Este é um achado muito importante e também destaca a importância do sistema de saúde pública para manter a VA ativa para detectar o surgimento de tipos não comuns com potencial neurotrópico.

As análises filogenéticas dos tipos EV mais frequentemente detectados mostraram que os isolados CVB3 de Moçambique foram geneticamente semelhantes entre si e o isolado mais similar foi o reportado no Japão.

A análise dos isolados E7 de estudo indicou a existência de três grupos diferentes. Ambos associados a casos de PFA outros países africanos no quais Moçambique mantém estreitas laços de contato entre os povos (118).

Os isolados CVB5, E6 e E11 apresentaram-se de um modo geral intimamente relacionado a outros isolados em diferentes países, sugerindo a circulação mundial desses vírus (132), o que pode dever-se ao comércio e viagens internacionais, que podem facilitar a introdução de novos agentes infecciosos em regiões geograficamente distantes (38). Moçambique mantém estreitas relações e de cooperação com vários países incluindo China, RDC, Índia, Japão, Nigéria, Senegal e África do Sul, o que pode facilmente permitir a circulação de vírus entre esses países apesar destes países possuírem sistema de vigilância clínico e ambiental.

Não ouve uma estreita relação entre os tipos de enterovírus liberados nas fezes e os isolados do esgoto. Apenas dois tipos detectados em amostras de esgoto foram encontrados em amostras clínicas e muitos detectados clinicamente não encontrados em esgotos, isto pode ser pelo curto espaço de tempo de coleta simultâneo de amostras clínicas e ambientais ou mesmo porque alguns vírus são difíceis de recuperar e sequenciar a partir de amostras de águas (133).

Por outro lado, a detecção dos vírus na água de esgoto podem ser preditores de alguns dos tipos de EV que serão predominantes clinicamente nos próximos meses e reflete o que está a circular na comunidade, torna a VA um método sensível para detectar vírus



que circulam silenciosamente (133). A detecção dos sorotipos CVB5 e EV-B75 em amostras clínicas e esgoto, sugere que esses vírus já estão circulando amplamente no país (130).

Em relação à vigilância ambiental, o uso de apenas único método de concentração foi um limitante. Além disso, o tempo de coleta não cobriu o ano inteiro. O longo período de armazenamento após a coleta em relação à inoculação em linhagens celulares pode ter influenciado na porcentagem de isolamento ou mesmo isolamento de outros tipos ou espécies.

No geral, o presente trabalho fornece informações valiosas sobre a VA, revelando o padrão de circulação de tipos de enterovírus com capacidade de infectar o sistema nervoso. Além disso, sugere-se a implementação de um programa vigilância ambiental em Moçambique principalmente nas áreas urbanas.

## **6. PERSPECTIVAS**

Estabelecer diagnóstico rotineiro de enterovírus, através da técnica *Semi-nested* PCR, na rotina da Vigilância Nacional de Diarreias no Instituto Nacional de Saúde, em Moçambique.

Realizar um estudo caso controle de base comunitária numa área rural, de modo a aferir a ocorrência dos enterovírus em casos de GA neste meio.

Advogar junto ao Comitê Nacional de Peritos em Pólio e o Programa Alargado de Vacinação, órgãos do Ministério de Saúde de Moçambique, para a implementação da vigilância ambiental no país.

## 7. CONCLUSÕES

Este estudo ilustrou que enterovírus são agentes etiológicos a considerar em uma proporção significativa na doença diarreica, especialmente quando os resultados mostram-se negativos para outros agentes entéricos que causam diarreia e demonstrou o valor agregado da vigilância ambiental de enterovírus, particularmente em ambientes com vigilância clínica limitada.

- Os enterovírus circulam em percentuais consideráveis em casos de diarreia aguda em Moçambique
- A faixa etária dos 12 a 23 meses apresenta maior positividade, gravidade, período de duração da diarreia e de hospitalização nos casos de detecção de enterovírus.
- Os fatores climáticos apresentam correlação positiva com a infecção por enterovírus, nas diferentes regiões do país.
- Raros tipos de enterovírus (EV-B75, EV-B97, EV-C113, EV-A119) foram detectados em casos de doença diarreica.
- Os enterovírus foram detectados em elevada frequência em amostras de esgoto da cidade e Maputo.
- Os *Enterovirus B* foram excretados pela população na cidade de Maputo e o EV-B75 mostrou-se estreitamente ligado a casos de paralisia flácida aguda.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Diarrhoea. 2020.
2. UNICEF. Diarrhoeal disease. 2018.
3. WHO. Global Health Observatory (GHO) data. 2019.
4. GBD 2015b. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980 – 2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(1459–544).
5. MISAU, INE, ICFI. Inquérito Demográfico e de Saúde 2011. Maputo, Mozambique; 2011.
6. UNICEF. One is too many: Ending child deaths from pneumonia and diarrhoea. UNICEF. 2016 Nov;77.
7. Kotloff KL. The Burden and Etiology of Diarrheal Illness in Developing Countries. *Pediatric Clinics of North America*. 2017.
8. Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus Disease in Finnish Children : Use of Numerical Scores for Clinical Severity of Diarrhoea1 Episodes. *Scand J Infect Dis*. 1990;22(16):259-267.
9. MISAU, INE, ICF, 2015. Inquérito de Indicadores de Imunização, Malária e HIV/SIDA em Moçambique 2015. Maputo, Moçambique; 2018. p. 453.
10. GBD 2015a. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990 – 2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(1545–602).
11. Chansaenroj J, Tuanthap S, Thanusuwannasak T, Duang-In A, Klinfueng S, Thaneskongtong N, et al. Human enteroviruses associated with and without diarrhea in Thailand between 2010 and 2016. *PLoS One*. 2017;12(7):1–13.
12. Finkbeiner SR, Allred AF, Tarr PI, Klein EJ, Kirkwood CD, Wang D. Metagenomic Analysis of Human Diarrhea : Viral Detection and Discovery. *PLoS Pathog*. 2008;4(2).
13. Chia JK, Chia AY. Acute gastritis associated with enterovirus infection. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(1):16–7.
14. Rao DC, Ananda Babu M, Raghavendra A, Dhananjaya D, Kumar S, Maiya PP. Non-polio enteroviruses and their association with acute diarrhea in children in India. *Infect Genet Evol*. 2013 Jul;17:153–61.
15. Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick

- JL, Monath TP RB& SS, editor. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins; 2001. p. v2: 723-767.
16. da Silva EE, de Azevedo JPR, Costa E V. Enterovirus de Importância Médica. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 1st ed. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan; 2005. p. 1681 – 1700.
  17. Nikonov OS, Chernykh ES, Garber MB, Nikonova EY. Enteroviruses : Classification , Diseases They Cause , and Approaches to Development of Antiviral Drugs. *Biochem*. 2017;82(13):1615–31.
  18. Lugo D, Krogstad P. Enteroviruses in the early 21st century : new manifestations and challenges. 2016;107–13.
  19. Majer A, Mcgreevy A, Booth TF, Elias E, Silva D, Majer A. Molecular Pathogenicity of Enteroviruses Causing Neurological Disease. *Front Microbiol*. 2020;11(April):1–22.
  20. N K, BL S, PG R, Al E. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*. 1981;291:547–553.
  21. Racaniello VR, Baltimore D, Hi B. Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(8):4887–91.
  22. WHO. Enterovirus surveillance guidelines. 2015; Available from: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf)
  23. Patil PR, Chitambar SD, Gopalkrishna V. Molecular Surveillance of Non-Polio Enterovirus Infections in Patients With Acute Gastroenteritis in Western India : 2004 – 2009. *J Med Virol*. 2014;(May):2004–9.
  24. Silva PA, Stark K, Mockenhaupt FP, Reither K, Weitzel T, Ignatius R, et al. Molecular characterization of enteric viral agents from children in Northern Region of Ghana. *J Med Virol*. 2008;
  25. Nagabushana D, Rao DC PS. A Clinical and Epidemiological Study of Enterovirus Associated Diarrhea in A Clinical and Epidemiological Study of Enterovirus. *J Pediatr Sci*. 2014;6:e212.
  26. Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile : Picornaviridae. *J Gen Virol*. 2017;(98):2421–2.
  27. Picornaviridae.com. Picornaviridae homepage. 2020.

28. Simmonds P, Gorbalenya AE, Hovi HHT, Lindberg NJKAM. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Arch Virol.* 2020;165(3):793–7.
29. Enterovirus. *Viral zone.* 2020.
30. Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM. The life cycle of non- polio enteroviruses and how to target it. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(June).
31. Lulla V, Dinan AM, Hosmillo M, Chaudhry Y, Sherry L, Irigoyen N, et al. enteroviruses modulates virus infection in gut. *Nat Microbiol.* 2018;
32. ICTV. *Picornaviridae.* 2020.
33. Abad FX, Pinto RM, Bosch PA. Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;156.
34. Dorval BL, Chow M KA. Stabilization of poliovirus against heat inactivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;159(3):1177–83.
35. Schaar HM Van Der, Dorobantu CM, Albuлесcu L, Strating JRPM, Kuppeveld FJM Van. Fat ( al ) attraction : Picornaviruses Usurp Lipid Transfer at Membrane Contact Sites to Create Replication Organelles. *Trends Microbiol.* 2016;xx:1–12.
36. Lai JKF, Sam I, Chan YF. The Autophagic Machinery in Enterovirus Infection. *Viruses.* 2016;32(8).
37. Racaniello V. *Picornaviridae: The Viruses and Their Replication.* In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP RB& SS, editor. *Fields Virology.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott- Williams & Wilkins; 2001. p. v2: 685-722.
38. Santos NS de O, Romanos MTV, Wigg MD. *Virologia humana [Internet].* 3rd ed. Santos NS de O, Romanos MTV, Wigg MD, editors. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2015. 606 p. Available from: [www.editoraguanabara.com.br](http://www.editoraguanabara.com.br)
39. Delogu R, Battistone A, Buttinelli G, Fiore S, Fontana S, Amato C, et al. Poliovirus and Other Enteroviruses from Environmental Surveillance in Italy, 2009–2015. *Food Environ Virol.* 2018 Dec 1;10(4):333–42.
40. CDC. *Non-Polio Enterovirus.* Center for Disease Control and prevention. 2018.
41. Gondo, K., Kusuhara, K., Take, H., & Ueda K. Echovirus type 9 epidemic in Kagoshima, Southern Japan. *Pediatr Infect Dis J.* 1995;14(9):787–791.
42. Bero DM, Nilsa de D, Eliane V da C, Fernanda MB, Ilesh VJ, Edson E da S. Natural circulation of human enterovirus in Maputo city, Mozambique. *African J Microbiol Res.* 2015;9.

43. Dechkum N, Pangsawan Y, Jayavasud SS. Coxsackie B Virus Infection and Myopericarditis in Thailand, 1987-1989. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal.* 1998;29 (2):273–6.
44. Torcia MG, Nencioni L, Clemente AM, Civitelli L, Celestino I, Limongi D, et al. Sex Differences in the Response to Viral Infections : TLR8 and TLR9 Ligand Stimulation Induce Higher IL10 Production in Males. *PLoS One.* 2012;7(6):1–8.
45. Klein SL, Huber S. Sex Differences in Susceptibility to Viral Infection. In: Klein S.L, W RC, editors. *Sex Hormones and Immunity to Infection.* eds. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. p. 93–122.
46. Jenista J A, Powell KR, Menegus MA. Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J Pediatr.* 1984;104(5):685–690.
47. Pons-salort M, Oberste MS, Pallansch MA, Abedi GR, Takahashi S, Grenfell BT. The seasonality of nonpolio enteroviruses in the United States : Patterns and drivers. *PNAS.* 2018;115(12):3078–3083.
48. Ndiaye AK, Diop PAM, Diop OM. Environmental surveillance of poliovirus and non-polio enterovirus in urban sewage in Dakar, Senegal (2007-2013). *Pan Afr Med J.* 2014;19:243.
49. WHO. Circulating vaccine-derived poliovirus type 2 – Mozambique. 2019. p. 25 January.
50. Harris KG, Coyne CB. Cytokine & Growth Factor Reviews Death waits for no man – Does it wait for a virus ? How enteroviruses induce and control cell death. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(5):587–96.
51. Saraswathy R. The genetics of post-polio syndrome - much to be unravelled! *Indian J Med Res.* 2016;144(1):9–10.
52. Lo JK, Robinson LR. POST-POLIO SYNDROME AND THE LATE EFFECTS OF POLIOMYELITIS : PART 2 . TREATMENT , MANAGEMENT , AND PROGNOSIS. *Muscle Nerve.* 2018;58:760–9.
53. Ramalho E, Jr IS, Burlandy F, Costa E, Dias A, Serrano R, et al. Identification and Phylogenetic Characterization of Human Enteroviruses Isolated from Cases of Aseptic. *Viruses.* 2019;11(690):2013–7.
54. Chen B, Lee H, Lee K, Gong Y, Cosby SL. Enterovirus and Encephalitis. *Front Microbiol.* 2020;11(February):1–15.

55. Qi X, Lu Q, Hu J, Xiong S. Spontaneous C - cleavage of a truncated intein as fusion tag to produce tag - free VP1 inclusion body nanoparticle vaccine against CVB3 - induced viral myocarditis by the oral route. *Microb Cell Fact.* 2019;1–14.
56. Huang W, Lee P, Chang L, Kao C. Short Communication Epidemic Pleurodynia Caused by Coxsackievirus B3 at a Medical Center in Northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2010;43(6):515–8.
57. Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, Cardoso MJ, Solomon T. Clinical features , diagnosis , and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol.* 2010;9(11):1097–105.
58. Takechi M, Fukushima W, Nakano T, Inui M, Ohfuji S, Tetsuo K, et al. Nationwide Survey of Pediatric Inpatients With Hand, Foot, and Mouth Disease, Herpangina, and Associated Complications During an Epidemic Period in Japan: Estimated Number of Hospitalized Patients and Factors Associated With Severe Cases. *J Epidemiol.* 2019;29(9):354–62.
59. Sun J, Hu X, Yu X. Current Understanding of Human Enterovirus D68. *Viruses.* 2019;11(490).
60. Rao D, Reddy H, Sudheendra K, Raghavendra A, Varadharaj V, Edula S, et al. Non-polio enterovirus association with persistent diarrhea in children as revealed by a follow-up study of an Indian cohort during the first two years of life. *J Clin Virol.* 2014;1–7.
61. Gosert R, Heininger U, Hirsch HH. Enterovirus detection in patients with acute gastroenteritis in Switzerland. *J Med Virol.* 2018;90(4):685–91.
62. Griffin DW, Donaldson KA, Paul JH, Rose JB. Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(1):129–43.
63. Vaccine Assessment and Monitoring of the Department of Vaccines and Biologicals, World Health Organization: Vaccine Assessment and Monitoring of the Department of Vaccines and Biologicals. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. *Who/V&B.* 2003;03(03).
64. Bisseux M, Colombet J, Mirand A, Roque-Afonso AM, Abravanel F, Izopet J, et al. Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: A one-year experiment in central France, 2014 to 2015. *Eurosurveillance.* 2018 Feb 15;23(7).
65. Wyn-Jones AP, Sellwood J. A review: Enteric viruses in the aquatic environment. *Journal of Applied Microbiology.* 2001.



66. Thongprachum A, Fujimoto T, Takanashi S, Saito H, Okitsu S, Shimizu H, et al. Detection of nineteen enteric viruses in raw sewage in Japan. *Infect Genet Evol.* 2018 Sep 1;63:17–23.
67. Tao Z, Wang Z, Lin X, Wang S, Wang H, Yoshida H, et al. One-year Survey of human enteroviruses from sewage and the factors affecting virus adsorption to the suspended solids. *Sci Rep.* 2016 Aug 11;6.
68. Wang H, Tao Z, Li Y, Lin X, Yoshida H, Song L, et al. Environmental Surveillance of Human Enteroviruses in Shandong Province, China, 2008 to 2012: Serotypes, Temporal Fluctuation, and Molecular Epidemiology. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(15):4683–91.
69. Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman GS. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol.* 2007;45(12):3996–4005.
70. Pereira J de OS, da Silva LR, de Meireles Nunes A, de Souza Oliveira S, da Costa EV, da Silva EE. Environmental Surveillance of Polioviruses in Rio de Janeiro, Brazil, in Support to the Activities of Global Polio Eradication Initiative. *Food Environ Virol.* 2016 Mar 1;8(1):27–33.
71. Werneck LMC, Baptista ML, Miagostovich MP, da Silva EE. Dissemination of enteroviruses in the production chain of organic lettuce in Rio de Janeiro, Brazil. *Microbiologyopen.* 2019;8(3):1–5.
72. Ivanova, Yarmolskaya, Eremeeva, Babkina, Baykova, Akhmadishina, et al. Environmental Surveillance for Poliovirus and Other Enteroviruses: Long-Term Experience in Moscow, Russian Federation, 2004–2017. *Viruses* [Internet]. 2019;11(5):424. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/5/424>
73. Polio laboratory manual. World Health. 2004;
74. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive , Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2698–704.
75. Garon J, Seib K, Orenstein WA, Ramirez A, Blanc DC, Zaffran M, et al. Expert Review of Vaccines Polio endgame : the global switch from tOPV to bOPV. 2016;0584(March).
76. Anasir MI, Poh CL. Advances in Antigenic Peptide-Based Vaccine and Neutralizing Antibodies against Viruses Causing Hand , Foot , and Mouth Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;

77. Benschop KS, van der Avoort HG, Duizer E, Marion PK. Review Antivirals against enteroviruses: a critical review from a public-health perspective. *Antivir Ther.* 2015;130:121–30.
78. Ministério da Saúde (MISAU). SARA 2018 Inventario Nacional. Maputo, Mocambique; 2020.
79. de Deus N, Chilaúle JJ, Cassocera M, Bambo M, Langa JS, Siteo E, et al. Early impact of rotavirus vaccination in children less than five years of age in Mozambique. *Vaccine.* 2018;
80. INE. RESULTADOS DEFINITIVOS INSTITUTO NACIONAL DE ESTATISTICA [Internet]. Maputo; Available from: [www.ine.gov.mz](http://www.ine.gov.mz)
81. Bauhofer AFL, Cossa-Moiane I, Marques S, Guimarães, Esperanca L Munlela B, Anapakala E, Chilaule JJ, et al. Intestinal protozoan infections among children 0-168 months with diarrhea in Mozambique : June 2014 - January 2018. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(4):1–17.
82. WHO. Basic laboratory methods in medical parasitology. Geneva, Switzerland.; 1991.
83. Phan TG, Nguyen TA, Shimizu H, Yagyu F, Okitsu S, Müller WEG, et al. Identification of enteroviral infection among infants and children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Med Virol.* 2005;
84. Dgedge M, Novoa A, Macassa G, Sacarlal J, Black J, Michaud C, et al. The burden of disease in Maputo City, Mozambique: registered and autopsied deaths in 1994. *PubMed Cent PMCID PMC2566439.* 2001;79(6):546–552.
85. Nhampossa T, Mandomando I, Acacio S, Quintó L, Kotloff K, Farag T, et al. Diarrheal Disease in Rural Mozambique : Burden , Risk Factors and Etiology of Diarrheal Disease among Children Aged 0 – 59 Months Seeking Care at Health Facilities. *PLoS One.* 2015;12–23.
86. Acácio S, Mandomando I, Nhampossa T, Quintó L, Vubil D, Sacoor C, et al. Risk factors for death among children 0 – 59 months of age with moderate-to-severe diarrhea in Manhiça district, southern Mozambique. *BMC Infect Dis.* 2019;(19:322):1–14.
87. Kotloff KL, James P Nataro, William C Blackwelder, Dilruba Nasrin, Tamer H Farag, Sandra Panchalingam, Yukun Wu, Samba O Sow, Dipika Sur, Robert F Breiman, Abu S G Faruque, Anita K M Zaidi, Debasish Saha, Pedro L Alonso, Boubou Tamboura,

Doh Sanogo MML. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS ): a prospective, case-control study. *Lancet*. 2013;6736(13):1–14.

88. Muchangos A dos. Moçambique Paisagens e Regiões Naturais [Internet]. Tipografia Globo, Lda. 1999. 5–163 p. Available from: <http://197.249.65.74:8080/biblioteca/bitstream/123456789/458/1/MOCAMBIQUE, PAISAGENS E REGIOES NATURAIS.pdf>
89. Embrapa. Mapa de Africa e Moçambique. 2010.
90. OpenEpi. OpenEpi. Toolkit Shell for Developing New Applications. 2020.
91. Jr IPS, Burlandy FM, Tavares FN, Silva EE. Enterovirus B74 associated with hand , foot and mouth disease. *Infect Genet Evol*. 2018;65(July):15–7.
92. Clark K, Karsch-mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(November 2015):67–72.
93. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7 : Improvements in Performance and Usability Article Fast Track. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772–80.
94. Matic I, Ahel I, Hay RT. jModelTest 2 : more models , new heuristics and parallel computing CircadiOmics : integrating circadian genomics , transcriptomics , proteomics. *Nat Methods*. 2012;9(8):772.
95. Stamatakis A. RAxML Version 8 : A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinforma Adv*. 2014;2010–1.
96. Boom R, Sol JA, Salimans MMM, Jansen, CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 1990.
97. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;
98. Rezapkin G, Chumakov K, Lu Z, Ran Y, Dragunsky EM, Levenbook IS. Microevolution of Sabin 1 Strain in Vitro and Genetic Stability of Oral Poliovirus Vaccine. *Virology*. 1994;202(1):370–8.
99. Langa S, Thompson R, Arnaldo P, Resque HR, Rose T, Enosse SM, et al. Epidemiology of Rotavirus A Diarrhea in Chokwe, Southern Mozambique, From February to September, 2011. *J Med Virol*. 2016;(March).

100. Mota BDL, Primo EG, Monteiro JC, Cunha CCC, Freitas FB, Wanzeller ALM, et al. High circulation of non-polio enteroviruses among hospitalized children with acute gastroenteritis in Belém ,Northern Brazil. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2016;7(1):79–83.
101. Coutinho CRM, Machado RS, Tavares FN, Da R, Bandeira S, Ferreira JL, et al. Enterovirus detection and serotyping of fecal material collected from three children living on the outskirts of Belém city, Amazon region, Brazil, during the first 3 years of life ( 1983 - 1986 ). *J Med Virol*. 2019;(December):1–10.
102. Sherchand JB, Thakali O, Sherchan JB, Bhandari D, Tandukar S, Paudel KP, et al. Hospital based surveillance and molecular characterization of rotavirus in children less than 5 years of age with acute gastroenteritis in Nepal. *Vaccine* [Internet]. 2018;36(51):7841–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.044>
103. Levy K, Nelson KL, Hubbard A, Eisenberg JNS. Rethinking Indicators of Microbial Drinking Water Quality for Health Studies in Tropical Developing Countries : Case Study in Northern Coastal Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86(3):499–507.
104. Okour A, Al-ghazawi Z, Gharaibeh M, Valley J. Diarrhea among children and the household conditions in a low- income rural community in the Jordan Valley Diarrhea Among Children and the Household Conditions in a Low-Income Rural Community Community in the Jordan Valley. *Jordan Med J*. 2012;46(2):108–17.
105. Kang G, Arora R, Chitambar SD, Deshpande J, Gupte MD, Kulkarni M, et al. Multicenter , Hospital-Based Surveillance of Rotavirus Disease and Strains among Indian Children Aged under 5 Years. *J Infect Dis*. 2009;147–53.
106. Bachrach LR, Gardner JM. Caregiver knowledge , attitudes , and practices regarding childhood diarrhea and dehydration in Kingston , Jamaica. *Pan Am J Public Heal*. 2002;12(1):37–44.
107. Thiam S, Diène AN, Fuhrmann S, Winkler MS, Sy I, Ndione JA, et al. Prevalence of diarrhoea and risk factors among children under five years old in Mbour, Senegal: a cross-sectional study. *Infect Dis Poverty*. 2017;6:109:1–12.
108. Mekonnen GK, Mengistie B, Sahilu G, Mulat W, Kloos H. Caregivers ' knowledge and attitudes about childhood diarrhea among refugee and host communities in Gambella Region , Ethiopia. *J Heal Popul Nutr*. 2018;37:24:1–11.
109. Feleke H, Medhin G, Asrat D. Household-stored drinking water quality among households of under-five children with and without acute diarrhea in towns of Wegera

- District , in North Gondar , Northwest Ethiopia. *Env Monit Assess.* 2018;190: 669.
110. Acácio S, Nhampossa T, Quintó L, Sacoó C, Kotloff K, Farag T, et al. The role of HIV infection in the etiology and epidemiology of diarrheal disease among children aged 0 – 59 months in Manhiça District , Rural Mozambique. *Int J Infect Dis.* 2018;73:10–7.
  111. Cui B, Zhang D, Pan H, Zhang F, Farrar J, Law F, et al. Viral aetiology of acute respiratory infections among children and associated meteorological factors in southern China. *BMC Infect Dis.* 2015;15(1).
  112. Majumdar M, Sharif S, Klapsa D, Wilton T, Masroor Alam M, Fernandez-Garcia MD, et al. Environmental surveillance reveals complex enterovirus circulation patterns in human populations. *Open Forum Infect Dis.* 2018;5(10):1–9.
  113. Khetsuriani N, Kutateladze T, Zangaladze E, Shutkova T, Peñaranda S, Nix WA, et al. High degree of genetic diversity of non-polio enteroviruses identified in Georgia by environmental and clinical surveillance, 2002-2005. *J Med Microbiol.* 2010;59(11):1340–7.
  114. Sadeuh-Mba SA, Bessaud M, Massenet D, Joffret M, Endegue M, Njouom R. High Frequency and Diversity of Species C Enteroviruses in Cameroon and Neighboring Countries. *J Clin Microbiol.* 2013;51(3):759–70.
  115. Yamashita T, Ito M, Tsuzuki H, Sakae K, Minagawa H. Molecular identification of enteroviruses including two new types (EV-98 and EV-107) isolated from Japanese travellers from Asian countries. *J Gen Virol.* 2010;91(4):1063–6.
  116. Toczyłowski K, Wiczorek M, Bojkiewicz E, Wietlicka-Piszcz M, Gad B, Sulik A. Pediatric enteroviral central nervous system infections in Białystok, Poland: Epidemiology, viral types, and drivers of seasonal variation. *Viruses.* 2020;12(8).
  117. Oberste MS, Maher K, Williams AJ, Dybdahl-sissoko N, Brown BA, Gookin MS, et al. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses : a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses Printed in Great Britain. *J Gen Virol.* 2006;119–28.
  118. Fernandez-Garcia MD, Kebe O, Fall AD, Ndiaye K. Identification and molecular characterization of non-polio enteroviruses from children with acute flaccid paralysis in West Africa, 2013-2014. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–11.
  119. Blomqvist S, Paananen A, Savolainen-Kopra C, Hovi T, Roivainen M. Eight years of experience with molecular identification of human enteroviruses. *J Clin Microbiol.*

2008;46(7):2410–3.

120. Brown BA, Maher K, Flemister MR, Naraghi-arani P, Uddin M, Oberste MS, et al. Resolving ambiguities in genetic typing of human enterovirus species C clinical isolates and identification of enterovirus 96 , 99 and 102. 2009;1713–23.
121. Khetsuriani N, Helfand R, Pallansch M, Kew O, Fowlkes A, Oberste MS, et al. Limited duration of vaccine poliovirus and other enterovirus excretion among human immunodeficiency virus infected children in Kenya. 2009;8:1–8.
122. Smura T, Blomqvist S, Vuorinen T, Ivanova O, Samoilovich E, Al-hello H. The Evolution of Vp1 Gene in Enterovirus C Species Sub-Group That Contains Types CVA-21, CVA-24, EV-C95, EV- C96 and EV-C99. PLoS One. 2014;9(4).
123. Brouwer L, Sanden SMG Van Der, Calis JCJ, Bruning AHL, Wang S, Wildenbeest JG, et al. High frequency of Polio - like Enterovirus C strains with differential clustering of CVA - 13 and EV - C99 subgenotypes in a cohort of Malawian children. Arch Virol. 2018;(0123456789).
124. Bessaud M, Pillet S, Ibrahim W, Joffret M-L, Pozzetto B, Delpeyroux F, et al. Molecular Characterization of Human Enteroviruses in the Central African Republic: Uncovering Wide Diversity and Identification of a New Human Enterovirus A71 Genogroup. J Clin Microbiol. 2012;1650–8.
125. Di Cristanziano V, Weimer K, Böttcher S, Sarfo FS, Dompok A, Cesar LG, et al. Molecular characterization and clinical description of non-polio enteroviruses detected in stool samples from HIV-positive and HIV-negative adults in Ghana. Viruses. 2020;12(2).
126. Benschop KSM, van der Avoort HG, Jusic E, Vennema H, van Binnendijk R, Duizer E. Polio and measles down the drain: Environmental enterovirus surveillance in the Netherlands, 2005 to 2015. Appl Environ Microbiol. 2017;83(13).
127. Durga Rao C, Yergolkar P, Shankarappa Subbanna K. Antigenic diversity of enteroviruses associated with nonpolio acute flaccid paralysis, India, 2007-2009. Emerg Infect Dis. 2012;18(11):1833–40.
128. Laxmivandana R, Cherian SS, Yergolkar P, Chitambar SD. Genomic characterization of coxsackievirus type B3 strains associated with acute flaccid paralysis in South-Western India. J Gen Virol. 2016;97(3):694–705.
129. Jk O, Obodai E, Diamenu S, Ahofo V, Addo J, Banahene B, et al. Virology : Current

research Environmental Surveillance for Poliovirus in Greater Accra and Eastern Regions of Ghana-2016. *Viol Curr Res* [Internet]. 2017;1(1):1–6. Available from: file:///Users/NicholasKiulia/Documents/Mendeley Desktop/Jk et al/Virology Current research/Jk et al. - 2017 - Virology Current research Environmental Surveillance for Poliovirus in Greater Accra and Eastern Regions of Ghana-20.pdf

130. Khetsuriani N, Kutateladze T, Zangaladze E, Shutkova T, Peñaranda S, Nix WA, et al. High degree of genetic diversity of non-polio enteroviruses identified in Georgia by environmental and clinical surveillance, 2002-2005. *J Med Microbiol*. 2010 Nov;59(11):1340–7.
131. Bingjun T, Yoshida H, Yan W, Lin L, Tsuji T, Shimizu H, et al. Molecular Typing and Epidemiology of Non-Polio Enteroviruses Isolated From Yunnan Province, the People's Republic of China. *J Med Virol*. 2008;4(80):670–9.
132. Krasota A, Loginovskih N, Ivanova O, Lipskaya G. Direct identification of Enteroviruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected meningitis by nested PCR amplification. *Viruses*. 2016;8(1).
133. Tiwari S, Dhole TN. Assessment of enteroviruses from sewage water and clinical samples during eradication phase of polio in North India. *Viol J*. 2018;15(1):1–8.

## **ANEXOS**



# ANEXO A. APROVAÇÃO PELO COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE DE MOÇAMBIQUE



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE  
IRB00002657

Exmo Senhor  
Dr. Diocreciano Bero  
INS

Ref: 154/CNBS/17

Data 12 de Maio de 2017

**Assunto:** Parecer do Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) sobre o estudo: "*Caracterização de enterovirus não-pólio detectados em crianças com diarreia aguda e em amostras ambientais na Cidade de Maputo, Moçambique*"

O Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) analisou as correcções efectuadas no protocolo de estudo intitulado: "*Caracterização de enterovirus não-pólio detectados em crianças com diarreia aguda e em amostras ambientais na Cidade de Maputo, Moçambique*"

Registado no CNBS com o número 108/CNBS/2016, conforme os requisitos da Declaração de Helsinquia.

Não havendo nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo, o CNBS dá a sua devida aprovação aos seguintes documentos:

- Protocolo de estudo versão 1.1 de Abril de 2016
- Consentimento informado
- Instrumentos de recolha de dados versão 1.1 de Abril de 2016

Todavia, o CNBS informa que:

- 1- Qualquer alteração a ser introduzida no protocolo, incluindo os seus anexos deve ser submetida ao CNBS para aprovação.
- 2- A presente aprovação não substitui a autorização administrativa.
- 3- Não houve declaração de conflitos de interesse por nenhum dos membros do CNBS.
- 4- A aprovação terá a validade de um ano, terminando esta a 12 de Maio de 2018. Os investigadores deverão submeter o pedido de renovação da aprovação um mês antes de terminar o prazo.
- 5- Recomenda-se aos investigadores que mantenham o CNBS informado do decurso do estudo.
- 6- A lista actualizada dos membros do CNBS está disponível na secretaria do Comité.

Sem mais do momento, as nossas mais cordiais saudações.



Dr. João Fernando Lima Schwalbach

C/c: Comité Institucional de Bioética do INS

ENDEREÇO:  
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
C. POSTAL 264  
Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende  
MAPUTO – MOÇAMBIQUE

Telefones: 430814/427131(4)  
Telex: 6-239 MISAU MO  
FAX: 258 (1) 426547  
258 (1) 33320

# ANEXO B. APROVAÇÃO PELO COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE DE MOÇAMBIQUE -VINADIA



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE  
IRB00002657

Exma Senhora  
Dr<sup>a</sup> Nilsa de Deus  
INS

Ref: 348/CNBS/13

Data 26 de Novembro de 2013

**Assunto:** Parecer do Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) sobre o estudo: "*Vigilância Nacional de Diarreias Agudas em Crianças (ViNaDiA)*"

O Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) analisou as correcções efectuadas no protocolo intitulado: "*Vigilância Nacional de Diarreias Agudas em Crianças (ViNaDiA)*", conforme os requisitos da Declaração de Helsínquia,

Não havendo nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo, o CNBS dá a sua devida aprovação.

Todavia, o CNBS recomenda aos investigadores que o mantenham informado do decurso do estudo, salientando que esta aprovação ética não substitui a autorização administrativa.

Com as nossas mais cordiais saudações.

O Presidente

  
Dr. João Fernando Lima Schwalbach



ENDEREÇO:  
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
C. POSTAL 264  
Av. Eduardo Mondlane/Salvador Allende  
MAPUTO – MOÇAMBIQUE

Telefones: 430814/427131(4)  
Telex: 6-239 MISAU MO  
FAX: 258 (1) 426547  
258 (1) 33320



correcto dos medicamentos, permite começar cedo o tratamento, produz dados epidemiológicos correctos, providencia razões para a tomada de medidas apropriadas para o isolamento dos pacientes e fornece informação de forma a adequar uma resposta rápida para prevenção de doenças. Uma parte da testagem será feita nos laboratórios dos hospitais onde as amostras serão recolhidas e o resto da amostra será enviada para os laboratórios centrais do Instituto Nacional de Saúde em Maputo, que possui condições para o resto dos processamentos.

### 3. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Caso o Senhor/a aceite que o seu filho participe no estudo, serão recolhidas amostras de fezes da criança e serão feitas perguntas pessoais e as respostas preenchidas num questionário preparado para o efeito. Por exemplo, algumas das perguntas que ser-lhe-ão feitas são: informação sobre a data de nascimento da criança, se mama, a quanto tempo a criança tem diarreia, a zona onde vive, a fonte de água, se tem animais em casa etc.

Depois do questionário, iremos colher uma amostra de fezes que será equivalente 1 colheres de sopa (10 ml) e uma zaragatoa rectal, para pesquisar vírus e parasitas e vamos colher também outra amostra de fezes com zaragato (rectal) para pesquisa de bactérias. Serão também colhidas duas gotas de sangue para testagem de HIV. Considerando que a seropositividade da mãe em relação ao HIV possa ser um factor de risco, será recolhida no cartão da criança, informação se a mãe é HIV positiva ou negativa. Depois de colhidas as amostras, serão guardadas no congelador a -80°C e serão testadas para a detecção de bactérias, vírus, parasitas e fungos mais importantes para a doença diarreica. Depois de processar as amostras no laboratório, as mesmas amostras serão guardadas durante 5 anos e usadas para futuras análises.

### 4. VANTAGEM DE PARTICIPAÇÃO NA VIGILÂNCIA

O seu filho/a não terá nenhuma vantagem especial por participar na vigilância. Será beneficiário dos resultados dos testes que serão feitos e também de um melhor tratamento. O diagnóstico dos microrganismos que causam a diarreia vai levar a um tratamento mais eficaz da doença da criança no futuro, e este estudo irá ajudar no desenvolvimento de estratégias para prevenir as doenças diarreicas e as mortes causadas por diarreia.

### 5. RISCO, STRESS, DOR E DESCONFORTO ASSOCIADOS A SUA PARTICIPAÇÃO

Os riscos de participação são mínimos, porque não se trata de um estudo interventivo, no entanto, poderão constituir riscos mínimos o desconforto/dor durante a colheita da amostra de sangue. O pessoal envolvido no estudo será treinado para recolher informações sobre a doença com respeito e sensibilidade.

## 6. INFORMAÇÃO ACERCA DA CONFIDENCIALIDADE

Toda a informação colhida durante a participação neste estudo será tratada de forma confidencial. Os investigadores comprometem-se a não revelar a identidade do seu filho/a em qualquer publicação resultante deste estudo.

## 7. DIREITOS DURANTE A PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO

Os registos relativos à participação do seu filho/a serão usados para a monitoria clínica do mesmo. Será atribuído um número de identificação ao seu filho/a e este número será usado em todos os formulários e amostras laboratoriais. Apenas os investigadores do estudo, membros do comité de ética terão acesso à informação que liga nome da criança com o seu número do estudo.

Poderá ter acesso à informação clínica e dos exames laboratoriais do seu filho em qualquer altura. A participação na vigilância é completamente voluntária. Todos os testes laboratoriais são gratuitos. Se recusar participar continuará a receber tratamento no Hospital da mesma forma que vem a fazer. Se não estiver satisfeito com a participação no estudo, poderá pedir que retirem o seu filho/a em qualquer altura sem que isto afecte os seus cuidados médicos presentes ou futuros.

## 8. QUEM PODE CONTACTAR EM CASO DE DÚVIDAS E/OU PROBLEMAS?

Caso haja alguma dúvida relacionada a este protocolo deve contactar: Dra. Nilsa de Deus, Investigadora Principal do projecto (Tel: 84-3697690), Dra. Judite Salêça, médica e clínica do estudo (Tel:840514553), Dra. Jorfélia Chilaúle, coordenadora geral (Tel: 824343470) e para questões éticas deve contactar o Comité Institucional de Bioética para Saúde do Instituto Nacional de Saúde (Tel: 21311038).

## 9. DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE:

Fui informado verbalmente e por escrito sobre este estudo e compreendo do quê se trata. Sei também a quem contactar se necessitar mais informação. Compreendo que a confidencialidade será mantida. Compreendo que sou livre de retirar o meu filho/a do estudo em qualquer altura sem que isto afecte os cuidados normalmente recebidos. Concordo que as amostras sejam guardadas durante 5 anos após o fim do estudo, e testadas no futuro para detecção de qualquer agente que os investigadores julguem importante ou realização de testes relevantes que possam melhorar o conhecimento sobre a área das diarreias. Concordo com a participação do meu filho/a neste estudo como sujeito voluntário e levarei uma cópia desta folha de informação para guardar.

-----  
Data e hora:

-----  
Nome do pai ou tutor Legal

-----  
Nome da testemunha

-----  
Assinatura (ou impressão do polegar) do pai ou tutor Legal

-----  
Assinatura da testemunha

10. DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR:

Eu, abaixo-assinado, defini e expliquei ao pai/tutor Legal numa linguagem que ele compreende, os procedimentos do estudo, os seus objectivos e o risco e benefícios associados com a sua participação. Informei o voluntário que a confidencialidade será mantida e que este é livre de se retirar o seu filho ou educando do estudo em qualquer altura sem que isto afecte os cuidados que recebe na clínica. Seguindo as minhas explicações o voluntário concorda participar no estudo.

-----  
Data e hora

-----  
Nome do investigador/técnico

-----  
Assinatura

## ANEXO D. FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

	<b>Instituto Nacional de Saúde</b> Departamento de Pesquisa	<b>ViNaDia</b>
Revisão: 0.4  Página 1 de 4	<b>Formulário de Recolha de Dados</b>	CRF_VINADIA_01
<b>I. DADOS DA UNIDADE SANITÁRIA E DA CRIANÇA</b>		
1 Data da entrevista: ____ / ____ / ____ <span style="font-size: small;">D D M M A A A A</span>		2a NID do paciente: ____ / ____ 2b Número de estudo: _____ 2c NIA: _____
3 Nome do Hospital:		4 Nome da mãe/cuidador:
5 Contacto da mãe/cuidador:		6 Nome da criança: 7 Apelido da criança:
8 Província:		9 Cidade:
10 Distrito:		11 Local de residência:
12 Tratado na:	1 Enfermaria	2 Banco de Socorros /ICD (com fluidos IV)
13 Data de admissão: ____ / ____ / ____ <span style="font-size: small;">D D M M A A A A</span>		14 Hora aproximada de admissão: ____ : ____ <span style="font-size: small;">H H MM</span>
15 Idade da criança em meses: ____		16 Data de nascimento da criança: ____ / ____ / ____ <span style="font-size: small;">D D M M A A A A</span>
17 Sexo:	M Masculino	F Feminino
18 A criança é prematura?	1 Sim	2 Não
19 Peso da criança ao nascer (gramas):	_____	
20 Peso actual:	_____ Quilogramas	21 Altura actual: _____ <span style="font-size: small;">Centímetros</span>
22 Perímetro braquial:	_____ centímetros	
23 Tratamento	1 Oral	2 Intravenoso
	3 Oral e Intravenoso	4 Outros:

<b>II. HISTÓRICO CLÍNICO DA CRIANÇA</b>																			
24 Data de início da diarreia: ____ / ____ / ____ <span style="font-size: small;">D D M M A A A A</span>																			
25 A criança tem diarreia aguda? <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 99-Não sabe																			
25a Se sim, Duração de diarreia: _____ (Dias)					25b Número de episódios de diarreia em 24 horas? _____														
26 A criança tem diarreia crónica? <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 99-Não sabe																			
26a Se sim, Duração de diarreia: _____ (Dias)					26b Número de episódios de diarreia em 24 horas? _____														
27 A criança tem diarreia com sangue? <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 99-Não sabe																			
28 A criança teve vômito? (Se Não ou Não sabe saltar para P31)																			
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%; text-align: center;">1</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">Sim</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">2</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">Não</td> <td colspan="5"></td> </tr> </table>											1	Sim	2	Não					
	1	Sim	2	Não															
29 Quantos dias antes da admissão a criança começou com vômitos?					_____ dias (digite 99 se Não sabe)														
30 Número de episódios de vômito em 24 horas?					_____ episódios (digite 99 se Não sabe)														
31 Antes de vir ao hospital criança recebeu reidratação oral (SRO)?																			
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%; text-align: center;">1</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">Sim</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">2</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">Não</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">99</td> <td colspan="4" style="text-align: center;">Não sabe</td> </tr> </table>											1	Sim	2	Não	99	Não sabe			
	1	Sim	2	Não	99	Não sabe													
32 Na chegada/admissão (ex: antes da reidratação), Qual era o estado geral da criança?																			
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%; text-align: center;">1</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">Bem, alerta (Satisfatório)</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">2</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">Inquieto, irritável (Moderado)</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">3</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">Letárgica ou inconsciente</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">99</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">Não sabe</td> </tr> </table>											1	Bem, alerta (Satisfatório)	2	Inquieto, irritável (Moderado)	3	Letárgica ou inconsciente	99	Não sabe	
	1	Bem, alerta (Satisfatório)	2	Inquieto, irritável (Moderado)	3	Letárgica ou inconsciente	99	Não sabe											
32 Na admissão ou durante o internamento a criança teve olhos encovados?																			
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%; text-align: center;">1</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">Sim</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">2</td> <td colspan="3" style="text-align: center;">Não</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">99</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">Não sabe</td> </tr> </table>											1	Sim	2	Não			99	Não sabe	
	1	Sim	2	Não			99	Não sabe											
33 Antes da admissão (ex: antes da reidratação) qual é o estado de hidratação?																			
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%; text-align: center;">1</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">Bebia normalmente, sem sede</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">2</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">Sedente, bebeu avidamente</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">3</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">Bebia mal, não era capaz de beber</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">99</td> <td colspan="2" style="text-align: center;">Não sabe</td> </tr> </table>											1	Bebia normalmente, sem sede	2	Sedente, bebeu avidamente	3	Bebia mal, não era capaz de beber	99	Não sabe	
	1	Bebia normalmente, sem sede	2	Sedente, bebeu avidamente	3	Bebia mal, não era capaz de beber	99	Não sabe											

34 Na chegada/admissão (ex: antes da reidratação), descrever o turgor da pele quando beliscar o abdômen?	1	Volta rapidamente (ex: imediatamente)	2	Volta lentamente (ex: 1-2 segundos)	3	Volta muito lentamente (ex: mais de 2 segundos)	99	Não sabe	
35 Nível de desidratação	1	Severa/Grave	2	Moderada	3	Choque	4	Nenhum	
36 A criança teve história de febre?	1	Sim	2	Não	99	Não sabe			
37 A temperatura mais alta que a criança apresentou?	_____ . ____ ° Centígrados (digite 99 se Não sabe)								
38 A criança recebeu antibióticos recentemente?	1	Sim	2	Não	99	Não sabe			
39 Por quanto tempo a criança tomou antibióticos?	1	Menos de 7 dias	2	Mais de 7 dias	99	Não sabe	88	Sem antibióticos	
40 Se tomou antibióticos, especifique quais:									
41 A criança foi hospitalizada por diarreia anteriormente? (sem contar como esta)?	1	Sim	2	Não	99	Não sabe			
42 Se Sim, quantas vezes nos últimos 12 meses?	_____ digite 88 se Não foi hospitalizado; digite 99 se Não sabe								
43 A criança apresenta alguma condição crônica?	1	Sim, especifique:			2	Não	99	Não sabe	
44 A criança tem malnutrição?	1	Sim	2	Não	99	Não sabe			
45 A criança tem malária?	1	Sim	2	Não	99	Não sabe			
46 A criança tem pneumonia?	1	Sim	2	Não	99	Não sabe			
47 A amostra de fezes foi colhida?	1	Sim	2	Não (passa para P49)			48 Data de colheita: _____ / _____ / _____ D D M M A A A A		
49 Características das fezes?	1	Aquosa	2	Semi-pastosa	3	Pastoso	4	Com sangue	
					5	Em forma de água de arroz		6	Mucosa
50 Data de envio da amostra ao laboratório:	_____ / _____ / _____ D D M M A A A A								

### III. CARTÃO DE SAÚDE DA CRIANÇA / REGISTO HISTÓRICO DE VACINAÇÃO

*Por favor veja o cartão de saúde da criança. Se o cartão estiver disponível, use-o para documentar a história de vacinação abaixo. Se o cartão de saúde existe, mas não está disponível/presente no momento da entrevista, solicitar o pai / cuidador para que traga o cartão para o hospital e completar o histórico de vacinação mais tarde ou completar a história de vacinação usando o registro de vacinação no centro de saúde onde a criança foi vacinada. Faça uma cópia do cartão de saúde da criança.*

51 A criança já foi vacinada?	1	Sim	2	Não (passe para P53)	99	Não sabe		
52 Onde a criança recebeu a vacinação (circule em TODOS que se apliquem e especifique o LOCAL onde a vacina foi recebida)?	1	Centro de Saúde ou Clínica Especifique (Nome do Centro, Vila, Distrito):						
	2	Hospital: Especifique (Nome Hospital, Distrito):						
	3	Outro; Especifique:						
	4	Todas opções acima						
	99	Não sabe / Desconhecido						
53 Qual foi a fonte de informação da vacinação?	1	Cartão de saúde	2	Registos clínicos	3	Verbal	99	Não sabe
54 Cópia de cartão de vacinação feita?	1	Sim	2	Não	99	Não sabe		



55 A criança recebeu as seguintes vacinas?							
a. Rotarix / Rotavirus?	1	Sim	2	Não	9	Não sabe	Data da 1 dose: ____/____/____ D D M M A A A A Data da 2 dose: ____/____/____ D D M M A A A A
b. Pólio oral (ao nascer)?	1	Sim	2	Não	9	Não sabe	Data da recepção: ____/____/____ D D M M A A A A
c. Pólio oral?	1	Sim	2	Não	9	Não sabe	Data da 1 dose: ____/____/____ D D M M A A A A Data da 2 dose: ____/____/____ D D M M A A A A Data da 3 dose: ____/____/____ D D M M A A A A

d. Pentavalente?	1	Sim	2	Não	9	Não sabe	Data da 1 dose: ____/____/____ D D M M A A A A Data da 2 dose: ____/____/____ D D M M A A A A Data da 3 dose: ____/____/____ D D M M A A A A
e. Pneumococo?	1	Sim	2	Não	9	Não sabe	Data da 1 dose: ____/____/____ D D M M A A A A Data da 2 dose: ____/____/____ D D M M A A A A Data da 3 dose: ____/____/____ D D M M A A A A
f. Sarampo?	1	Sim	2	Não	9	Não sabe	Data da recepção: ____/____/____ D D M M A A A A
g. Vacina Injectada contra a Poliomielite?	1	Sim	2	Não	9	Não sabe	Data da recepção: ____/____/____ D D M M A A A A

IV. ESTADO DE HIV								
56 Qual é o estado de HIV da criança? (Se a criança é HIV negativo, passe para P57)	1	Positivo	2	Negativo	3	Indeterminado	99	Não sabe
57 Estado de HIV da mãe?	1	Positivo	2	Negativo	3	Indeterminado	99	Não sabe
58 Se Mãe HIV positivo, fez PTV?	1	Sim	2	Não	3	Não sabe		

V. SITUAÇÃO FAMILIAR													
59 Qual é a relação com a criança?	1	Mãe	2	Pai	3	Outros familiares	4	Guardião					
60 Quem cuida da criança?	1	Mãe	2	Pai	3	Tio/Tia	4	Avós	5	Irmão/Irmã	6	Babá	
<b>61 Sustento da família:</b>													
a Pai trabalha	1	Sim	2	Não	99	Não sabe	b Mãe trabalha	1	Sim	2	Não	99	Não sabe
c Auto-emprego (pai)	1	Sim	2	Não	99	Não sabe	d Auto-emprego (mãe)	1	Sim	2	Não	99	Não sabe
e Agricultura	1	Sim	2	Não	99	Não sabe	f Avós trabalham	1	Sim	2	Não	99	Não sabe
g Tio/Tia trabalham	1	Sim	2	Não	99	Não sabe	h Outro	1	Sim	2	Não	99	Não sabe

62 No total, quantas pessoas incluindo a criança, regularmente dormem (vivem) na casa de noite na casa onde a criança morra?																									
63 CONTADO OS CASOS, quantas crianças abaixo dos 5 anos de idade (ex: permanecem pelo menos 4 noites por semana) na residência?																									
64 Qual é a idade (em anos) da mãe ou acompanhante da criança no momento da visita ao hospital? (digite 99 se Não sabe)																									
65 Qual é o grau alto de escolaridade da mãe ou acompanhante?		1	Não estudou		2	Primário		3	Secundário		4	Técnico		5	Universitário/acima										
66 Estado marital da mãe?		1	Casada		2	Solteira		3	Divorciada		4	União de facto		5	Viúvo										
67 Qual é o grau alto de escolaridade do pai?		1	Não estudou		2	Primário		3	Secundário		4	Técnico		5	Universitário/ acima										
68 Tem electricidade na residência?			1	Sim				2	Não		99	Não sabe													
69 Tipo de habitação?			1	Casa de caniço				2	Casa de barro		3	Casa de alvenaria													
70 Qual é a fonte de água para beber?		1	Canalizada na casa/pátio		2	Torneira pública/fontenária		3	Furo		4	Poço tapado		5	Poço aberto		6	Rio/Lago/Lagoa		7	Água Mineral/Engarrafada		99	Não sabe	
71 A água é tratada?		1	Sim, Fervura		2	Sim, Cloração		3	Sim, Filtração		4	Sim, outro, especifique:				5	Não		99	Não sabe					

72 Quais dos seguintes itens tem na sua casa?														
a. Rádio			1	Sim		2	Não		99	Não sabe				
b. Televisão			1	Sim		2	Não		99	Não sabe				
c. Geleira			1	Sim		2	Não		99	Não sabe				
d. Colchão			1	Sim		2	Não		99	Não sabe				
e. Bicicleta			1	Sim		2	Não		99	Não sabe				
f. Motorizada			1	Sim		2	Não		99	Não sabe				
g. Carro			1	Sim		2	Não		99	Não sabe				
h. Celular			1	Sim		2	Não		99	Não sabe				
i. Computador			1	Sim		2	Não		99	Não sabe				
73 Tipo de alimentação da criança?			1	Leite materno		2	Leite artificial		3	Misto (Materno e Artificial)		88	Outro	
74 Idade de desmame em meses: ____ (Se Não sabe, digite 99).														

VI. FACTORES DE RISCO E EPIDEMIOLÓGICOS																							
75 Na residência houve algum caso de diarreia nos últimos 7 dias?												1	Sim		2	Não		99	Não sabe				
76 A criança participou de alguma festa ou evento social nos últimos 7 dias?												1	Sim, Especifique qual:		2	Não		99	Não sabe				
77 A criança tem contacto com animais?												1	Sim		2	Não		99	Não sabe				
78 Se Sim, que animais?			1	Cão		2	Gato		3	Vaca		4	Porco		5	Cabrito		6	Rato		4	Outro, Especifique:	

### VII. ALTA E DESFECHO

<b>79</b> Data da alta:    ___ ___ / ___ ___ / ___ ___ ___ ___ <span style="margin-left: 100px;">D D</span> <span style="margin-left: 30px;">M M</span> <span style="margin-left: 30px;">A A A A</span>				<b>85</b> Hora aproximada da alta:    ___ ___ : ___ ___ <span style="margin-left: 150px;">H H</span> <span style="margin-left: 30px;">M M</span>						
<b>80</b> Desfecho:	1	Melhorou	2	Óbito	3	Transferido para outro hospital	4	Abandono	99	Não sabe

**81** Comentários gerais:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**82** Preenchido por: \_\_\_\_\_ . Data \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ \_\_\_ \_\_\_  
D D    M M    A A A A

**83** Revisto por: \_\_\_\_\_ . Data \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ / \_\_\_ \_\_\_ \_\_\_ \_\_\_  
D D    M M    A A A A

## ANEXO E. ESCALA DE GRAVIDADE DA DIARREIA (RUUSKA E VESIKARI)

Sinais e sintomas	Pontos
<b>Duração da diarreia (dias)</b>	
1 - 4	1
5	2
>= 6	3
<b>Número máximo de evacuações/ 24 h</b>	
1 - 3	1
4 - 5	2
>= 6	3
<b>Duração de vômitos (dias)</b>	
1	1
2	2
>= 3	3
<b>Número máximo de vômitos/ 24h</b>	
0	0
1	1
2 - 4	2
>= 5	3
<b>Febre</b>	
=< 37,0 °C	0
37,1 – 38,4 °C	1
38,5 – 38,9 °C	2
>= 40 °C	3
<b>Desidratação</b>	
Nenhuma	0
1 a 5 %	2
>= 6 %	3
<b>Tratamento</b>	
Nenhum	0
Reidratação	1
Internamento	2
<b>Total de pontos</b>	<b>20</b>

### Categoria dos níveis de gravidade

0 a 5 pontos	Leve
6 a 10 pontos	Moderado
11 a 15 pontos	Grave
16 a 20 pontos	Muito grave

# ANEXO F. AUTORIZAÇÃO DO CONSELHO MUNICIPAL DA CIDADE DE MAPUTO



MUNICÍPIO DE MAPUTO  
CONSELHO MUNICIPAL  
DIRECÇÃO MUNICIPAL DE INFRA-ESTRUTURA  
DEPARTAMENTO DE ÁGUA E SANEAMENTO

AO

INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE

*San Nilsa de Deus*

*23.08.17*

S/REF	N/REF <u>436</u> /DMI/DAS-RAA/17	Data: <u>15</u> /08/2017
-------	----------------------------------	--------------------------

Assunto: ESTUDO SOBRE CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROVIRUS NÃO-PÓLIO EM CRIANÇAS COM DIARREIA AGUDA E EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Acusamos a recepção da vossa nota nº 839/052/33, datada 01 de Agosto do ano corrente, através da qual V.Excia, solicita autorização para o início do estudo supracitado.

Assim, aproveitamos a ocasião de agradecer e informar que não existe nenhuma objecção por parte desta unidade orgânica na realização do mesmo, devendo V.Excia dar devido seguimento.

Com os nossos melhores cumprimentos.

Directora Adjunta

*[Signature]* 15-08-17  
/Cirece Alice M. Chaly/

MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE
ENTRADA <u>455</u>
DATA <u>23</u> / <u>8</u> / <u>17</u>
ASS <u>[Signature]</u>

## APÊNDICE

## APÊNDICE A. INICIADORES E CONDIÇÕES UTILIZADAS NAS REAÇÕES

Iniciadores	Orientação	Sequências (5' → 3') <sup>a</sup>	Tamanho do Amplicom (pb)
Primer time RT-qPCR	Iniciador 1	GGC CCC TGA ATG CGG CTA	NA
	Iniciador 2	AGG AAA CAC GGA CAC CCA AA	NA
	Sonda	56-FAM/AAG TCY GTG/ZEN/GCG GAA CCG ACT A/3IABkFQ	NA
292		MI GCI GYI GAR CAN GG	357
222		CIC CIG GIG GIA YRW ACA T	762
224		GCI ATG YTI GGI ACI CAY RT	762
AN89	Senso	TAC TGG ACC ACC TGG NGG NAY RWA CAT	348-393
AN88	Reverso	CCA GCA CTG ACA GCA GYN GAR AYN GG	348-393
Y7	Senso	GGG TTT GTG TCA GCC TGT AAT GA	1100
Q8	Reverso	ACY AAG AGG TCT CTA TTC CAC	1100

a - R= A/G; M=A/C; W=A/T; I=A/C/G/T; K=G/T; Y=C/T (Código IUPAC de bases degeneradas)

### Condições de amplificação

Método	Etapa 1		Etapa 2		Ciclos						Extensão final				Tamanho do produto PCR (bp)	
	°C	Ⓛ	°C	Ⓛ	°C	Ⓛ	°C	Ⓛ	°C	Ⓛ	N° de ciclos	°C	Ⓛ	°C		Ⓛ
RT-qPCR	45	10:00	95	10:00	95	00:15	60	00:45			45					
C-DNA 1	70	10:00	8	∞												
C-DNA 2	42	2	8	∞												
C-DNA 3	42	50	8	∞												
292/222					94	00:30	42	00:30	60	00:40	32	72	7	8	∞	338
224/222					95	00:30	42	00:30	60	00:40	35	72	5	8	∞	660
CDNA (RT)	22	10:00	42	60:00	95	05:00	8	∞								
224/222 (1)					95	00:30	42	00:30	60	00:45	40	8	∞			762
A88/A89 (2)			95	05:00	95	00:30	60	00:20	72	00:15	40	8	∞			348-393
Q8/Y7					94	00:40	55	00:40	72	02:00	32	72	7	8	∞	
Ciclo-Seq Degen					96	00:30	42	00:30	60	03:00	25	8	∞			

## PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES NOS ÚLTIMOS ANOS

1. Nilsa de Deus, Igor Paulo Ubisse Capitine, Adilson Fernando Loforte Bauhofer, Selma Marques, Marta Cassocera, Assucênio Chissaque, **Diocreciano Matias Bero**, José Paulo Langa, Fernando Manuel Padama, Visalakshi Jeyaseelan, M. Steven Oberste, Concepcion F. Estivariz, Harish Verma, Ilesh Jani, Ondrej Mach, Roland W. Sutter. 2020. *Immunogenicity of reduced-dose monovalent type 2 oral poliovirus vaccine in Mocuba, Mozambique*. The Journal of Infectious Diseases. **Artigo aceite para publicação.**

2. Adilson Fernando Loforte Bauhofer, Idalécia Laurinda Carlos Cossa-Moiane, Selma Domingos Amadeu Marques, Esperança Lourenço Alberto Mabandane Guimarães, Benilde António Munlela, Elda Muianga Anapakala, Jorfélia José Chilaúle, Marta Alverina Paulino Cassocera, Jerónimo Souzinho Langa, Assucênio Hortêncio Chissaque, Júlia Assiat Monteiro Sambo, Lena Vânia Manhique-Coutinho, **Diocreciano Matias Bero**, Timothy Allen Kellogg, Luzia Augusta Pires Gonçalves, Nilsa Olívia Razão de Deus. 2020. *Intestinal Protozoa in Hospitalized Under-five Children with Diarrhoea in Nampula – a cross-sectional analysis in a low-income setting in Northern Mozambique*. BMC Infectious Diseases. **Artigo aceite para publicação.**

3. Eva D. João, Benilde Munlela, Assucênio Chissaque, Jorfélia Chilaúle, Jerónimo Langa, Orvalho Augusto, Simone S. Boene, Elda Anapakala, Júlia Sambo, Esperança Guimarães, **Diocreciano Bero**, Marta Cassocera, Idalécia Cossa-Moiane, Jason M. Mwenda, Isabel Maurício, Hester G. O'Neill and Nilsa de Deus. 2020. *Molecular Epidemiology of Rotavirus A Strains Pre- and Post-Vaccine (Rotarix®) Introduction in Mozambique, 2012–2019: Emergence of Genotypes G3P[4] and G3P[8]*. Pathogens 2020, 9, 671; doi:10.3390/pathogens9090671.

4. Bauhofer AFL, Cossa-Moiane I, Marques S, Guimarães EL, Munlela B, Anapakala E, Chilaúle JJ, Cassocera M, Langa JS, Chissaque A, Sambo J, Manhique-Coutinho L, **Bero DM**, Kellogg TA, de Deus N. 2020. *Intestinal protozoan infections among children 0-168*



*months with diarrhea in Mozambique: June 2014 - January 2018*. PLOS Neglected Tropical Diseases. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008195>.

5. Mussá TNI, **Bero, DM**, Cossa-Moiane, I, Taíbo, CLAF, e de Deus, N. *Diferenças de Género, Sexo E Susceptibilidade Às Doenças Infecciosas*. Revista Moçambicana de Ciências de Saude. Edição 2018.

6. de Deus N, Chilaúle JJ, Cassocera M, Bambo M, Langa JS, Siteo E, Chissaque A, Anapakala E, Sambo J, Guimarães EL, **Bero DM**, João ED, Cossa-Moiane I, Mwenda JM, Weldegebriel GG, Parashar UD, Tate JE. 2017. *Early impact of rotavirus vaccination in children less than five years of age in Mozambique*. Vaccine. Nov 8. pii: S0264-410X(17)31468-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.10.060. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29128381.

7. **Bero DM**. 2016. *Introdução à Educação em Saúde Pública*. Editora: Novas Edições Acadêmicas. 1ª edição. 100 pp. ISBN 10: 3841717713 ISBN 13: 9783841717719.

# ARTIGOS SUBMETIDOS A PUBLICAÇÃO

## ARTIGO 1

**Submitted to**

Journal of Medical Virology

**Manuscript ID**

JMV-20-10354

**Title**

Rarely described enteroviruses isolated from children with acute diarrhea: Mozambique, 2014 to 2018

## ARTIGO 2

### Virology Journal

**Environmental surveillance for polioviruses and non-polio enteroviruses in Mozambique, 2018**  
--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	VIRJ-D-20-00408	
<b>Full Title:</b>	Environmental surveillance for polioviruses and non-polio enteroviruses in Mozambique, 2018	
<b>Article Type:</b>	Research	
<b>Section/Category:</b>	Positive-strand RNA viruses	
<b>Funding Information:</b>	CNPq-TWAS (190897/2015-5)	Mr Diocreciano Matias Bero