



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MADINA LYVE DA SILVA SAMPAIO

**IDENTIFICAÇÃO DE BOCAVÍRUS HUMANO EM AMOSTRAS
FECAIS DE CRIANÇAS COM GASTROENTERITE AGUDA**

Salvador

2014

MADINA LYVE DA SILVA SAMPAIO

**IDENTIFICAÇÃO DE BOCAVÍRUS HUMANO EM AMOSTRAS
FECAIS DE CRIANÇAS COM GASTROENTERITE AGUDA**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do
Instituto de Ciências da Saúde da Universidade
Federal da Bahia, requisito para obtenção do grau de
Mestre em Biotecnologia, 2014.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lília Ferreira de Moura Costa
Co-orientador: Prof. Dr. Gúbio Soares Campos

Salvador

2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.

S192 Sampaio, Madina Lyve da Silva
Identificação de bocavírus humano em amostras fecais de
crianças com gastroenterite aguda./ Madina Lyve da Silva
Sampaio. – Salvador, 2014.
48 f.

Orientador: Prof^a. Dra. Lília Ferreira de Moura Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. Gastroenterologia. 2. Vírus. 3. Saúde. 4. Crianças. -Costa,
Lília Ferreira Moura. II. Universidade Federal da Bahia. III.
Título.

CDU 616.34

MADINA LYVE DA SILVA SAMPAIO

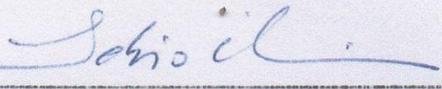
**Identificação de bocavírus humano em amostras fecais de
crianças com gastroenterite aguda**

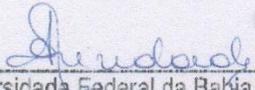
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 31 de outubro de 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Líliá Ferreira de Moura Costa – Orientadora 
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia

Fábio Alexandre Chinaglia 
Doutor em Environmental Microbiology pela University of Aberdeen,
ABDN, Escócia.
Universidade Federal da Bahia.

Soraya Castro Trindade 
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Estadual de Feira de Santana.

Aos meus pais Jaimir e Nanci Sampaio que sempre me mostraram o melhor caminho a seguir,
o estudo.

Ao meu irmão, Igor Gustavo, pelo apoio e o exemplo profissional.

À família, aos amigos e colegas que, direta ou indiretamente, me fizeram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a honra de vir ao mundo e me direcionar da melhor forma possível.

Às minhas amigas Adriane Cruz e Aryane Cruz, que me indicaram para fazer parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Virologia da UFBA.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Gúbio Campos, que me recebeu de braços abertos e mostrou a base necessária para que eu pudesse trilhar meu próprio caminho no campo da pesquisa.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Lilia Ferreira, pela confiança, orientação e exemplo de profissional.

À Prof^a Dr^a. Silvia Sardi, que de certa forma me acolheu como “filha”, no que diz respeito a incentivar e dar os “puxões de orelha”, quando necessário, sem os quais não poderia ter chegado até aqui.

Às colegas do Laboratório de Virologia: Daniela, Géssica, Jaqueline, Aline, Rafaela e aos colegas Antônio e André que sempre que podiam colaboravam nos experimentos e com apoio moral. Em especial a professora Delane Tigre e a Prof^a. Dr^a. Fabiana Lopes, por terem me ajudado nos momentos decisivos e importantes do trabalho.

À querida amiga e também colega de curso, Adriana Andrade, que além de colaborar com ensinamentos foi uma das maiores incentivadoras que tive durante todo o curso.

Ao Prof. Dr. Fabio Alexandre Chinalia, pela simpatia e gentileza de passar os ensinamentos necessários no que diz respeito à criação e estudo de uma árvore filogenética.

À FAPESB, pelo financiamento do projeto que permitiu a execução desta dissertação.

Aos membros da Banca Examinadora, pela disposição de seu tempo e atenção.

Ao Hospital Aliança e ao Dr. Claudio José de Freitas Brandão pela parceria e colaboração.

“Se tudo fosse fácil, não haveria sonhos, se não houvesse sonhos, a vida não teria graça.”

Madina Lyve

SAMPAIO, Madina Lyve da Silva. Identificação de Bocavírus Humano em amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda. 51 f. 2014. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

RESUMO

A gastroenterite aguda é considerada uma importante causa de morbidade e mortalidade entre crianças em todo o mundo, especialmente nos primeiros anos de vida. Tal doença pode ser provocada por infecções causadas por bactérias, fungos, protozoários e, principalmente, vírus. Dentre as infecções virais, destacam-se: Norovírus (NoV), Rotavírus (HRV), Adenovírus (AdV) e, mais recentemente identificado, o Bocavírus Humano (HBoV). O HBoV possui DNA de fita simples, não envelopado e pertencente à família *Parvoviridae*, gênero *Bocavirus*. Apresenta quatro proteínas, sendo estas VP1 e VP2, proteínas estruturais, NS1, proteína não estrutural e a nucleoproteína NP1 com função desconhecida. Com o intuito de verificar a existência e determinar as espécies circulantes do HBoV em Salvador-Bahia, no período de Janeiro a Julho de 2012, o presente estudo analisou 105 amostras fecais de crianças menores de 5 anos de idade que deram entrada na emergência de uma Unidade Hospitalar com quadro clínico de gastroenterite aguda. Através da extração do DNA e posterior reação do nested-PCR foi possível observar que o HBoV estava presente em 42% das amostras testadas, percentual de positividade considerado alto quando comparado a outros estudos onde a frequência do vírus havia sido menor. Além disso, testes imunoenzimáticos também foram realizados nessas amostras para verificar a presença de viroses entéricas (NoV, HRV e AdV), revelando que 27% das amostras positivas para HBoV estavam co-infectadas com NoV e AdV, enquanto a maior parte tratava-se de infecção apenas por HBoV. O sequenciamento e análise filogenética das sequências virais mostraram que estas pertencem as espécies HBoV-1 e HBoV-2A, sendo esta última, até o momento, nunca relatada no Brasil. Por fim, o presente trabalho busca, de forma inovadora e pioneira no estado da Bahia, direcionar as pesquisas para este novo agente etiológico que vem sendo identificado em pacientes com sintomas de gastroenterite aguda em todo o mundo e que agora também foi detectado na população de Salvador.

Palavras chave: Bocavírus Humano, nested-PCR, co-infecção

SAMPAIO, Madina Lyve da Silva. Human Bocavirus identification in stool samples from children with acute gastroenteritis. 51f. 2014. Master Dissertation - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

Abstract

Acute gastroenteritis is considered an important cause of morbidity and mortality among children worldwide, especially in the first years of life. This disorder can be caused by infections caused by bacteria, fungi, protozoa and viruses mainly. Among the viral infections include: Norovirus (NoV), Human Rotavirus (HRV), adenovirus (AdV) and, more recently identified, the Human Bocavirus (HBoV). The HBoV DNA has a simple, non-enveloped and belongs to the *Parvoviridae* family, genus *Bocavirus*. Presents four proteins, VP1 and VP2 are structural proteins, NS1 and the nonstructural protein of unknown function NP1 phosphoprotein nuclear. Aiming to verify the existence and determine the species of HBoV circulating in Salvador, Bahia, in the period January to July 2012, this study analyzed 105 fecal samples from children under 5 years of age who were admitted in the emergency of a hospital unit with symptoms clinical acute gastroenteritis. Through DNA extraction and subsequent reaction of the nested-PCR was observed that HBoV was present in 42% of the samples tested, it is consider a high percentage of positivity, not befitting present some results in other studies where the frequency of the virus was lower. In addition, these samples were also performed, enzyme immunoassays for the presence of enteric viruses (NoV, HRV and AdV) revealing that 27% of samples positive for HBoV were co-infected with NoV and AdV, while most of this was just for HBoV infection. Sequencing and phylogenetic analysis of viral sequences showed that these belong to the HBoV-1 and HBoV-2A species, the latter being, so far, not been reported in Brazil. Finally, this paper seeks an innovative and pioneering way in the state of Bahia, influence research for this new etiologic agent has been identified in patients with symptoms of acute gastroenteritis worldwide and now has also been detected in the population of Salvador.

Keywords: Human Bocavirus, nested-PCR, coinfection

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Imagem de um aglomerado de vírus HBoV mostrado em microscopia eletrônica.....	19
Figura 2 Crioconstrução do HBoV. (A) demonstração da totalidade da cápside viral. (B) A mesma estrutura da imagem A, mas com a metade anterior removida.....	20
Figura 3 Esquema demonstrando o tamanho da fita de DNA do vírus e suas matrizes de leitura abertas (ORFs).....	20
Figura 4 Ciclo de replicação viral dos Parvovírus baseado no modelo de rolamento de “hairpin”.....	22
Gráfico 1 Resultado das amostras de fezes de crianças analisadas pela técnica de nested-PCR para a detecção de HBoV.....	32
Gráfico 2 Distribuição das viroses entéricas: NoV, AdV e HRV detectadas em crianças por testes imunoenzimáticos.....	33
Gráfico 3 Distribuição das co-infecções com NoV e AdV em amostras de fezes positivas para HBoV em crianças.....	35
Figura 5 Árvore filogenética das sequências parciais do gene que codifica a proteína VP1-VP2 do HBoV presente em amostras fecais de crianças da cidade de Salvador, Bahia.....	36
Quadro1 Cepas de HBoV selecionadas no GenBank de acordo com a espécie e procedência.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers utilizados no estudo.....	29
Tabela 2: Distribuição dos pacientes positivos para HBoV em relação à sua faixa.....	33
Tabela 3: Distribuição da idade dos pacientes positivos para NoV, AdV e HRV.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

AdV	Adenovírus
AstV	Astrovírus
BPV	<i>Bovine parvovirus</i> (Parvovirus Bovino)
CnMV	<i>Canine minute virus</i> (Minutovírus canino)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GBoV	Bocavirus gorila
HIV	Vírus da imunodeficiência Humana
HRV	Rotavírus
HBoV	<i>Human bocavirus</i> (Bocavírus humano)
ITRI	Infecção do Trato Respiratório Inferior
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia Viral)
IR	Infecção respiratória
IRA	Infecção respiratória aguda
IF	Imunofluorescência
NoV	Norovírus
Kb	1000 pares de base
NES	<i>Nuclear export sequence</i> (Sequência de exportação nuclear)
NS1	<i>Nonstructural protein 1</i> (Proteína não-estrutural 1)
NP1	Nuclear phosphoprotein 1 (Fosfoproteína nuclear 1)
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Região aberta de leitura)
OH	Hidroxila

Pb	Pares de Base
PBoV	Bocavírus Suíno
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão salina-fosfato)
PLA2	<i>Phospholipase</i> (Fosfolipase A2)
RSV	Vírus Sincicial Respiratório
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
RT-PCR	<i>Reverse transcription – polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa)
RPM	Rotações por Minuto VP1 <i>Viral protein 1</i> (Proteína viral estrutural 1)
VP2	<i>Viral protein 2</i> (Proteína viral estrutural 1)
S	Síntese
SaV	Sapovírus
TBE	<i>Tris/ Borate /EDTA</i>
TRIS	Hidroxi-Metil-Aminocetano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	HISTÓRICO	16
2.2	CLASSIFICAÇÃO	17
2.3	ESTRUTURA MORFOLÓGICA, GENÔMICA E PROTÉICA	18
2.4	REPLICAÇÃO VIRAL	21
2.5	PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	22
2.5.1	Transmissão	22
2.5.2	Quadros Clínicos	23
a)	Infecções Gastrointestinais	23
b)	Infecções Respiratórias	23
2.6	TRATAMENTO E CONTROLE	24
2.7	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	24
2.8	EPIDEMIOLOGIA	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	AMOSTRAGEM	28
4.2	DETECÇÃO DE NoV, HRV e AdV	28
4.3	DETECÇÃO DO HBoV	28
4.3.1	Extração do DNA viral	28
4.3.2	Nested-PCR	29
4.3.3	Eletroforese em gel de agarose	29
4.4	SEQUENCIAMENTO E CONSTRUÇÃO DA FILOGENÉTICA	30
5	RESULTADOS	32
5.1	OCORRÊNCIA DE HBOV	32
5.2	OCORRÊNCIA DE NOV, ADV E HRV	33
5.3	HBoV E COINFECÇÃO	34
5.4	ANÁLISE FILOGENÉTICA	35
6	DISCUSSÃO	37

7	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41
	ANEXO	49

1 INTRODUÇÃO

A gastroenterite infecciosa é uma patologia altamente contagiosa que vem se estabelecendo tanto em países desenvolvidos como em subdesenvolvidos e por isso é considerada uma importante causa de morbidade e mortalidade em crianças, especialmente nos primeiros anos de vida (RIMOLDI et al., 2011). Os agentes etiológicos dessa infecção podem ser de origem parasitária, bacteriana e/ou viral. Dentre os agentes virais, os que mais se destacam são: Norovírus (NoV), Rotavírus (HRV), Adenovírus (AdV) e mais recentemente descoberto, o Bocavírus Humano (HBoV) (LOVERIDGE et al., 2010).

O HBoV pertence à família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae* e gênero *Bocavirus*. O genoma viral é constituído de DNA de fita simples linear, com aproximadamente 5.3 Kb; é um vírus não envelopado, medindo de 18 a 26 nanômetros de diâmetro e com cápside icosaédrica formada por cerca de 60 capsômeros (SCHILDGEN et al., 2008).

O HBoV possui três matrizes de leitura (ORFs) codificando quatro proteínas: VP1 e VP2, proteínas estruturais (capsídio) do vírion; NS1, proteína não estrutural; e a fosfoproteína nuclear NP1, com função desconhecida (ALLANDER et al., 2005; SILVIA et al., 2011).

Esse vírus foi identificado pela primeira vez em 2005 na Suécia por Allander e colaboradores que ao analisarem secreções respiratórias de pacientes com pneumonia, diagnosticados negativamente para todos os vírus respiratórios estudados, chegaram a conclusão de que se tratava de um novo Parvovírus. Devido a sua relação próxima ao Parvovirus Bovino (BPV) e Minutovírus Canino (CnMV), o novo vírus foi então denominado Bocavirus Humano (ALLANDER et al., 2005).

Recentemente foram identificadas três novas espécies do vírus semelhantes ao HBoV, as quais foram chamadas provisoriamente de HBoV-2 (HBoV-2A e HBoV-2B), HBoV-3 e HBoV-4, sendo que o nome HBoV refere-se a espécie descoberta por Allander em 2005 e que passou então a ser descrita como HBoV-1 (KAPOOR et al., 2009; ARTHUR et al., 2009; KAPOOR et al., 2010).

Dentre os outros vírus que afetam o sistema gastrointestinal, encontra-se o HRV, um vírus RNA, que desde sua descoberta, em 1973, tem sido considerado como o maior responsável por diarreias agudas em crianças (RIMOLDI et al., 2011). Atualmente, observou-se que o NoV, vírus RNA positivo, é o agente viral de maior destaque mundial em casos de gastroenterite em todas as faixas etárias, seguido do HRV e do HBoV (LOVERIDGE et al., 2010; RIMOLDI et al., 2011). Alguns relatos também citam o AdV, vírus DNA, como um

agente etiológico de importância na gastroenterite viral depois de NoV e HRV (MOTAMEDIFAR et al., 2013).

Na Bahia, desde 2002, o grupo do Laboratório de Virologia do ICS-UFBA vem desenvolvendo estudos epidemiológicos voltados à investigação de gastroenterites virais, mostrando a predominância do HRV do grupo A e genótipo G9 em casos de diarreias agudas na população (CAMPOS et al., 2002; SANTOS et al., 2005; SERRAVALLE et al., 2007) e identificando pela primeira vez a presença do NoV em Salvador (CAMPOS et al., 2008), reconhecido oficialmente pela secretaria de saúde do estado da Bahia.

O HBoV é um agente viral que causa gastroenterite, mas ainda possui poucos estudos a nível mundial e no Brasil. O estudo aqui proposto visa, de forma inovadora e pioneira na Bahia e no Brasil, direcionar as pesquisas para este novo agente etiológico identificado em pacientes com quadro de gastroenterite aguda.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

O HBoV foi identificado pela primeira vez, como agente patógeno humano, em setembro de 2005, por Allander e colaboradores, em Estocolmo, na Suécia. Esse vírus foi encontrado em amostras de secreções nasofaríngeas de crianças hospitalizadas no período de novembro de 2003 a outubro de 2004, com Infecção do Trato Respiratório Inferior (ITRI). Objetivando rastrear a presença de possíveis agentes etiológicos as amostras de aspirados nasofaríngeos foram submetidas ao diagnóstico padrão de infecções do trato respiratório que é feito através da técnica de imunofluorescência (IF) e cultura de células, para detectar a presença dos Vírus da Influenza e Vírus Sincicial Respiratório (RSV). Após esse processo, as amostras foram submetidas à extração do material genético que em seguida foi amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o primer FR26RV-N. O produto da amplificação foi purificado e então ligado ao vetor pCR-Blunt, posteriormente introduzido na bactéria *Escherichia coli* TOP-10 para que as sequências de interesse fossem clonadas e então sequenciadas. Ao final do estudo, sete sequências virais distintas foram observadas, quatro contendo RNA e três contendo DNA. Dentre estas, duas amostras, ST1 (Estocolmo 1) e ST2 (Estocolmo 2), caracterizadas como sequências de Parvovírus, não apresentavam similaridade com amostras depositadas no banco de dados. Foi através da análise filogenética que se observou a semelhança dessas sequências aos Parvovírus CnMV e BPV, ambos pertencentes ao gênero *Bocavirus*, família *Parvoviridae* (ALLANDER et al., 2005; (ALLANDER et al., 2007).

Desde que foi descoberto em 2005 até os dias atuais, estudos passaram a encontrar o vírus do HBoV em amostras de pacientes com ITRI em todo mundo (BI et al., 2007; HUSTEDT et al., 2012; WANG et al., 201), assim como também em amostras de crianças com sintomas de gastroenterite aguda (VICENTE et al., 2007).

2.2 CLASSIFICAÇÃO

O HBoV é considerado um Parvovírus devido a sua homologia na sequência de nucleotídeos com esses vírus e por isso está incluso na família *Parvoviridae* (ALLANDER et al., 2005). Essa família se divide em duas subfamílias. A subfamília *Densovirinae*, que infecta invertebrados e compreende os gêneros: *Densovirus*, *Iteravirus*, *Brevidensovirus* e *Pefudensovirus*. A outra subfamília é a *Parvovirinae*, que acomete vertebrados e é composta por cinco gêneros: *Bocavirus*, *Parvovirus*, *Eritrovirus*, *Dependovirus* e *Amdovirus*. O gênero *Bocavirus*, por sua vez, subdivide-se em 5 espécies: *Parvovirus bovino* (BPV), *Canine minute virus* (CnMV), *Bocavirus gorila* (GBoV), *Bocavirus suíno* (PBoV) e *Bocavirus humano* (HBoV) (BERNS & PARRISH, 2007).

Assim como o HBoV, estão inseridos na família *Parvoviridae*, os vírus que infectam humanos, B19 e PARV-4. O B-19, do gênero *Eritrovirus*, possui DNA de fita simples, não envelopado, se replica em células eritróides da medula óssea e do sangue, e provoca sintomas como: eritema infeccioso, artropatia, erupção papular e em casos mais graves, encefalopatia e epilepsia. Já o PARV-4 é encontrado no sangue e tecido, principalmente de usuários de drogas injetáveis e indivíduos infectados por HIV, mas a sua patogenicidade na população humana não foi claramente estabelecida até o momento (GARCIA et al., 2009; CORCIOLI et al., 2010). Alguns membros da família *Parvoviridae* também infectam e causam doenças em animais, como é o caso do *Parvovirus canino* (CPV). Esse vírus provoca leucopenia e síndrome entérica principalmente em cachorros com 8 a 12 semanas de idade levando ao quadro clínico de: vômito, anorexia, febre e diarreia, condições que podem levar o animal a uma rápida desidratação. Tal fato conduz a hipótese de que o HBoV possa estar desempenhando um papel similar na doença gastrointestinal em humanos (ALBUQUERQUE et al., 2007).

De acordo com o estabelecido pelo VIII relatório do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), para serem consideradas espécies diferentes, estas precisam apresentar similaridade de sequências de nucleotídeos para a proteína não estrutural, abaixo de 95% (KAPOOR et al., 2009). Baseado nessa afirmação, 4 espécies distintas foram classificadas, são elas: HBoV-1 (ALLANDER et al., 2005), HBoV-2 (A e B) (KAPOOR et al., 2009), HBoV-3 (ARTHUR et al., 2009) e HBoV-4 (KAPOOR et al., 2010). Apesar de alguns estudos classificarem os HBoVs citados como “genótipos”, outros autores acreditam que a terminologia “espécie” seja mais adequada, já que genótipos de outros Parvovírus, tais como os relatados para B19 e PARV4, são muito menos divergentes entre si e não são classificados como espécies independentes. Em contrapartida, a espécie HBoV-2 é encontrada separada em dois genótipos,

HBoV-2A e HBoV-2B, que foram assim classificados com base no critério de divergência entre aminoácidos da proteína VP-1 (KAPOOR et al., 2009).

Relacionado à origem do HBoV-1, duas hipóteses foram relatadas: a primeira sugere que o HBoV-1 possa ter evoluído a partir de um HBoV entérico após adquirir tropismo pelo trato respiratório e a outra propõe que o HBoV-1 possa ter sido deglutido junto com secreções respiratórias contaminadas e assim ter sido transferido para o sistema gastrointestinal (KAPOOR et al., 2010; LEVICAN et al., 2013). Já a espécie HBoV-2 foi descoberta em amostras de fezes e possui alta semelhança com o HBoV-1, com 78%, 67%, e 80% de identidade com suas proteínas NS1, NP1 e VP2/VP1, respectivamente. Analisando a sequência genômica de HBoV-3, também descoberta em fezes, sugere-se que esta possa ter surgido a partir de um evento de recombinação genômica entre formas ancestrais das espécies 1 e 2 (ARTHUR et al., 2009). A análise da divergência da proteína NS1 do HBoV-4 mostrou que esta possui maior divergência entre as espécies HBoV-1 e HBoV-3 e menor, quando comparada a espécie HBoV-2 (ARTHUR et al., 2009).

2.3 ESTRUTURA MORFOLÓGICA GENÔMICA E PROTÉICA

Até hoje ainda existem dificuldades em cultivar o HBoV *in vitro*. Entretanto, através da microscopia eletrônica, pode-se perceber que a estrutura do HBoV é típica dos vírus da família *Parvoviridae* (**Figura 1**), ou seja, vírus pequeno, não envelopado, cápside com 18 a 26 nm de diâmetro composta por cerca de 60 capsômeros, simetria icosaédrica e presença de protuberâncias e depressões em sua morfologia (**Figura 2**) (KHAMRIN et al., 2012). O genoma viral da família apresenta-se não segmentado, com aproximadamente 5.3 Kb de tamanho, composto por ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita simples, com polaridade de ambos os sentidos, ou sentido único, e apresenta estruturas em forma de ganchos (*hairpins*) em suas extremidades (SILVA et al., 2010). É composta por três ORFs codificando quatro proteínas; a primeira codifica uma proteína viral não estrutural NS1 de função desconhecida, a segunda codifica duas importantes proteínas estruturais, VP1 e VP2, que compõe a cápside viral, e a terceira codifica uma fosfoproteína nuclear, não estrutural, NP1 (**Figura 3**) (ALLANDER et al., 2005; SCHILDGEN et al., 2008, JARTTI et al., 2012). Tanto os genes das proteínas não estruturais (NS1 e NP1) como das proteínas estruturais (VP1 e VP2) são utilizados para desenho de iniciadores. Enquanto os genes que codificam NS1 e NP1 formam uma região mais conservada do genoma, as regiões VP1 e VP2 apresentam uma maior variabilidade e por isso são mais utilizadas para estudos de filogenia e variabilidade (ALLANDER et al., 2005).

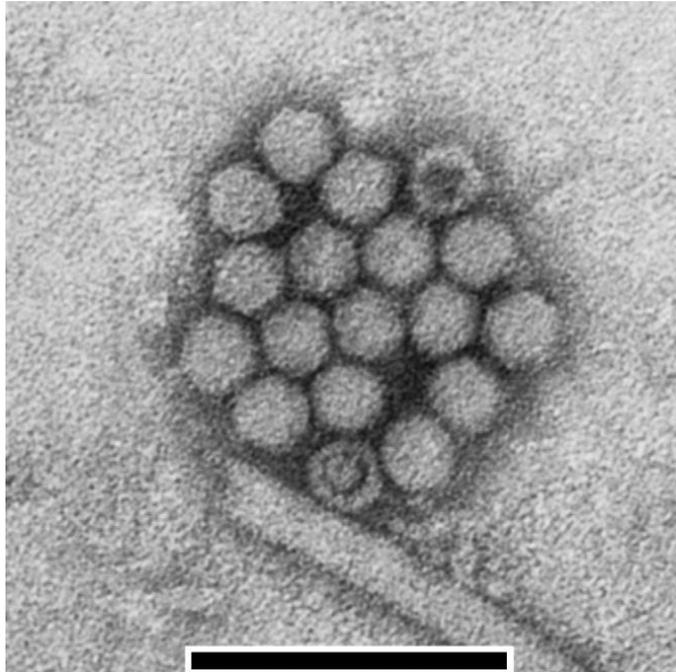


Figura 1: Imagem de um aglomerado de vírus HBV mostrado em microscopia eletrônica (Adaptado de SANTOS et al., 2010).

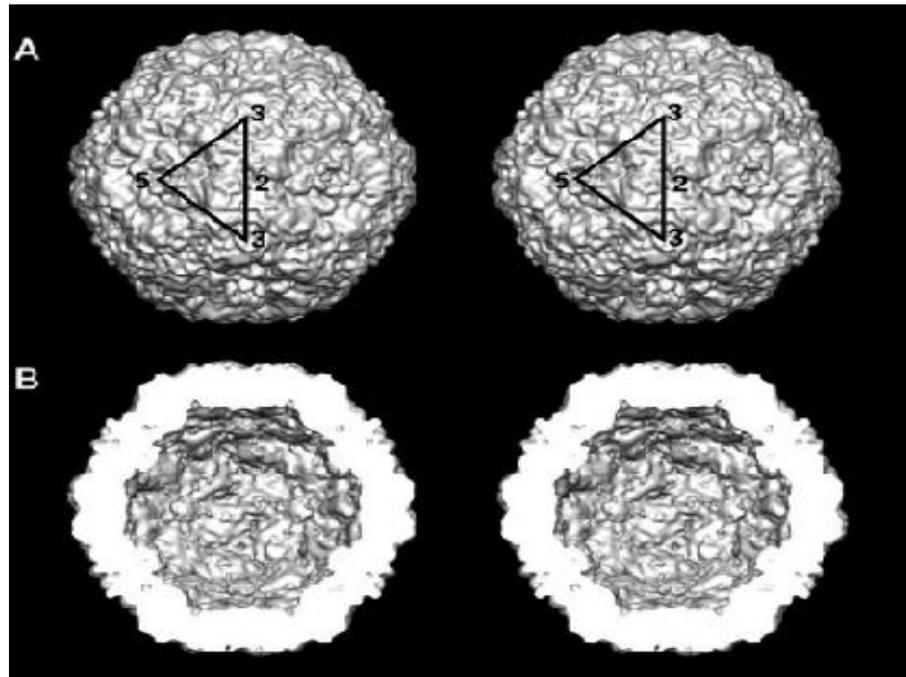


Figura 2: Crioreconstrução do HBoV. (A) demonstração da totalidade da cápside viral. (B) A mesma estrutura da imagem A, mas com a metade anterior removida (Adaptado de GURDA et al., 2010).

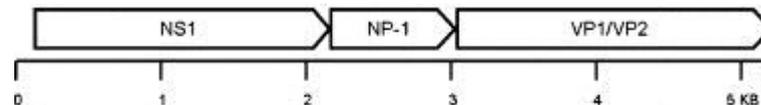


Figura 3: Esquema demonstrando o tamanho da fita de DNA do vírus e suas matrizes de leitura abertas (ORFs) (Adaptado de CHOW et al., 2010).

Em alguns Parvovírus, como no caso do CnMV, as proteínas não estruturais NS1 e NP1 apresentam fun o replicativa do DNA viral. No Parvovírus B19 é observado que a proteína VP1 apresenta em sua estrutura uma região com atividade enzimática de fosfolipase A2 (PLA2) que também é essencial no processo de replica o, já que libera o vírus do lisossomo após sua entrada na célula hospedeira (QU et al., 2008). De acordo com Allander e colaboradores, em alguns Parvovírus a sequência que codifica a VP2 está inserida dentro do gene que expressa VP1, sendo que ambas possuem sequências iguais na região 3'. Além disso, a porão N-

terminal de VP1 possui uma sequência que funciona como sinalizador para o genoma viral mostrando a localização do núcleo (BERNS & PARRISH, 2007).

2.4 REPLICAÇÃO VIRAL

Como ainda não foi possível cultivar o HBoV *in vitro*, não se sabe ao certo como ocorre a sua replicação em células hospedeiras. No entanto, o modelo do ciclo de replicação dos Parvovirus pode simular como provavelmente ocorre esse fenômeno (SHILDGEN et al., 2008).

Os Parvovírus, como já foi mencionado, são capazes de sintetizar apenas quatro proteínas, o que não é suficiente para que ocorra a replicação viral. Para que os vírus possam utilizar a maquinaria da célula hospedeira eles precisam infectá-la no momento em que esta esteja na fase S de divisão, obtendo assim todas as ferramentas necessárias para realizar o processo. O primeiro passo para a replicação, assim como em todos os vírus, é a adsorção e penetração na célula. Para que isso ocorra, os Parvovírus ligam-se aos receptores da superfície celular com auxílio de transferinas e então são englobados através de mediadores de clatrina, formando um endossomo. O endossomo então é transportado no citoplasma onde os lisossomos fusionam-se e vão degradando o capsídeo do vírus gradativamente até o DNA ser liberado e penetrar no núcleo pelos poros nucleares, processo mediado pela VP1. Embora o mecanismo seja desconhecido, considera-se que de 20 a 30 nucleotídeos da região 5' do DNA sirvam como primer para dar início ao processo de replicação mediado por DNA polimerase celular (BERNS & PARRISH).

A estrutura de “hairpin”, formada por palíndromos, presente na extremidade 3' do genoma viral é importante para a replicação porque serve como iniciador para síntese da cadeia complementar. O alongamento da fita ocorre através de ligações covalentes que vão de encontro com a extremidade 5' da fita mãe onde as extremidades são ligadas pela DNA-ligase da célula formando um modelo linear “duplex”. O “hairpin” recém-formado é clivado do lado direito, na estrutura 5', pela endonuclease viral NS1, fornecendo assim a porção 3'-OH como iniciador onde ambas as cadeias podem formar “hairpins”. Essas extremidades livres servirão como cadeia iniciadora para síntese de DNA que se estenderão em ambas as fitas servindo como molde para o reinício do processo replicativo ou serem encapsidados para formação de novos vírus (**Figura 4**). No núcleo, os capsômeros ligam-se ao DNA de fita simples viral e então são exportados para o citoplasma através do mecanismo de fosforilação da sequência de exportação nuclear (NES) presente na porção N-terminal da proteína VP2. A saída da progênie viral ocorre por lise ou exocitose (BERNS & PARRISH, 2007).

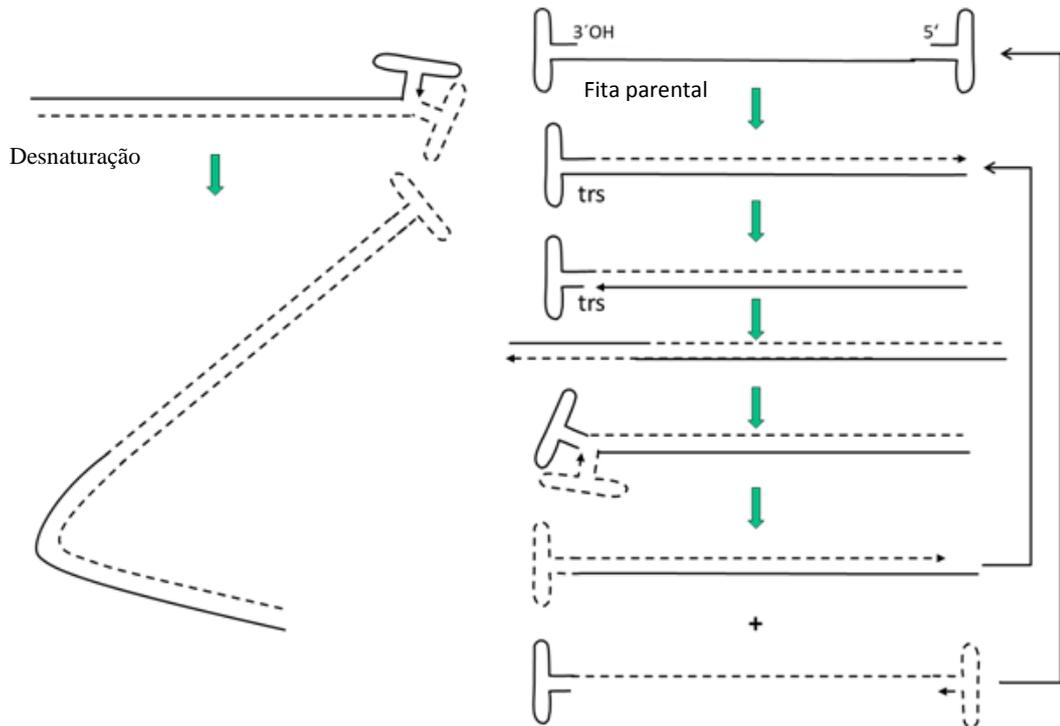


Figura 4: Ciclo de replicação viral dos Parvovírus baseado no modelo de rolamento de “hairpin” (Adaptado de BERNS & PARRISH, 2007).

2.5 PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

2.5.1 Transmissão

Assim como no caso de outras viroses entéricas, como NoV, AdV e HRV, o HBoV também possui rota de transmissão fecal-oral, ou seja, o indivíduo contrai a doença ao ingerir água ou alimentos contaminados com o vírus. Sendo assim, pacientes que residem em locais sem saneamento básico, não utilizam água filtrada para beber e não lavam corretamente os alimentos, estão mais susceptíveis a contrair essa patologia. Os vírus entéricos são predominantemente resistentes ao calor e a inativação de detergente já que não possuem envelope e, devido a este fato, podem se manter estáveis por longo tempo, aumentando assim a possibilidade de contágio entre os indivíduos. A transmissão também pode ocorrer em larga escala em creches e navios, onde o inadequado manuseio dos alimentos pode afetar um grande número de pessoas (CRAWFORD, 2000).

2.5.2 Quadros Clínicos

a) Infecções Gastrointestinais

A gastroenterite aguda é uma infecção provocada principalmente pela ação de agentes microbiológicos. Entre os principais patógenos virais associados a esta doença encontram-se HBoV, NoV, RHV e AdV. A atuação desses vírus reduzem a absorção de nutrientes pelas células da mucosa intestinal provocando diarreia osmótica e diarreia secretora, devido a lesão do epitélio da mucosa causado pela infecção, podendo também causar vômitos, dores abdominais e febre. A síndrome clínica consiste em um período de incubação de um a dois dias, seguido por 12 a 60 horas de vômitos e diarreias aquosas. A gastroenterite viral é uma doença de fácil disseminação, principalmente onde há exposição de múltiplos indivíduos a uma fonte comum, como em creches, hospitais, hotéis, etc (CRAWFORD, 2000; KOSEK et al., 2003).

Relatos da presença de HBoV em amostra de fezes de pacientes com gastroenterite aguda foram observados em alguns estudos sugerindo um possível tropismo do vírus ao trato digestivo (VICENTE et al., 2007; KAPOOR et al., 2009; ARTHUR et al., 2009; LEVICAN et al., 2013). No entanto, o papel do HBoV em doenças gastrointestinais ainda não está claro. A sintomatologia observada em humanos com gastroenterite aguda ocorre de maneira similar em cães que se infectam com o CPV, nesse caso, leucopenia e quadros diarreicos frequentes. Esse fato demonstra mais uma constatação de que o HBoV possa estar vinculado a gastroenterite aguda (ALBUQUERQUE et al., 2007). O HBoV também tem sido evidenciado em pacientes imunocomprometidos que possuem doença gastrointestinal, além disso, já foi relatado em casos de HIV positivo ou em pacientes recém transplantados (GARBINO et al., 2008).

b) Infecções Respiratórias (IR)

Além de estar associado a sintomas do trato gastrointestinal, o HBoV também tem sido identificado em amostras de pacientes com IR, o que levanta a possibilidade do vírus também estar relacionado com essa patologia. Os sintomas comumente descritos variam em intensidade desde um resfriado comum e desconfortável, mas autolimitado, a pneumonias que trazem riscos de vida. Em crianças hospitalizadas, bronquiolite, ataques de asma e chiados também são frequentemente relatados (JAQUES et al., 2008; ALLANDER et al., 2007; BOSIS et al., 2008).

Dos muitos vírus capazes de provocar infecção respiratória superior (rinite, sinusite, otite média, faringite e amigdalite) e inferior (bronquiolite, pneumonia intersticial e pleurite), os rinovírus e o vírus da influenza são os mais encontrados (SAMUELSON, 2000; FABBIANI et al., 2009).

2.6 TRATAMENTO E CONTROLE

Casos de gastroenterite viral não necessitam de tratamento específico, entretanto, em casos de desidratação, na forma grave, a terapêutica inicial visa corrigir o distúrbio hidroeletrolítico, principalmente, nas faixas etárias de maior comprometimento como crianças e idosos, bem como em populações de risco como imunossuprimidos e desnutridos que podem apresentar alterações circulatórias importantes, correndo risco de morte devido ao choque hipovolêmico e às toxinas. O tratamento da desidratação é feito, em geral, por via oral (nas formas leves ou moderadas) ou venosa nos casos onde ocorrem vômitos repetidos ou com desidratação grave (KING et al., 2003).

Com o advento da biologia molecular, várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de aprimorar o conhecimento dessas viroses entéricas e, conseqüentemente, desenvolver vacinas e drogas antivirais para a prevenção e tratamento destas infecções, pois até o momento, não existem medidas preventivas e terapêuticas eficazes para as mesmas.

As medidas que visam controlar e prevenir epidemias de gastroenterite viral no momento são: detecção e diminuição das fontes de contaminação de água e alimentos, isolamento de profissionais em contato com a fonte do agente e diminuição do contato pessoa-pessoa (SOUSA et al., 2012).

2.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O HBoV, desde a sua descoberta, tem sido identificado por meio de técnicas provenientes da biologia molecular. Para detectar o vírus, o principal método molecular usado é a PCR. As amostras utilizadas são provenientes de fezes e, quando associado a infecção respiratória, aspirados de nasofaringe ou swabs nasais (ARTHUR et al., 2009). Esta pode variar no que diz respeito aos primers e ciclos utilizados, além de amplificar regiões diferentes do genoma viral, a depender da sequência alvo escolhida para desenvolver a pesquisa (SLOOT, et al, 2007; KAPOOR et al., 2010). O HBoV também tem sido detectado através de técnicas mais avançadas, como é o caso da PCR em tempo real, no entanto, apesar de oferecer vantagens como maior sensibilidade e quantificação viral, ainda possui um custo elevado e por isso é pouco utilizada (CHOW et al., 2009).

O diagnóstico para outras viroses entéricas, que podem ser encontradas juntamente com o HBoV em amostras de fezes, NoV, AdV e HRV, é comumente baseado na detecção do vírus

em microscopia eletrônica, métodos imunoenzimáticos ou reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) (GREEN et al., 1995).

Até o momento não se obteve sucesso no cultivo em métodos de cultura do HBoV *in vitro* ou em modelos de animais (SHILDGEN et al., 2008).

2.8 EPIDEMIOLOGIA

De acordo com os estudos vigentes até o momento, pode-se perceber que o HBoV está presente em várias partes do mundo: América, Ásia, África, Europa e Oceania, demonstrando assim um perfil global de distribuição. Essa dispersão está relacionada tanto a pacientes com sintomas de infecção do sistema respiratório como também do trato gastrointestinal (ARTHUR et al., 2009; BASTIEN et al., 2006; PONS et al., 2009; SHEN et al., 2013). As quatro espécies de HBoV relatadas até o momento foram encontradas em ambas infecções. No entanto, a maioria dos estudos associam a espécie HBoV-1 ao trato respiratório enquanto as espécies HBoV-2, HBoV-3 e HBoV-4 são mais relacionadas ao trato gastrointestinal (KHAMRIN et al., 2012 a).

Grande parte dos estudos com o HBoV são realizados em crianças com a faixa etária inferior a 5 anos; nesses estudos o grupo de pacientes com idade entre 0 a 2 anos é o mais afetado. Entretanto, em alguns trabalhos são utilizados pacientes jovens e adultos que são relatados com baixos percentuais de detecção. Além disso, crianças com idade inferior a 6 meses são pouco acometidas pelo HBoV, fato que pode ser explicado devido ao alto teor de anticorpos que a criança recebe através do leite materno (BLINKOVA et al., 2009).

A maioria dos estudos relacionados à detecção do HBoV no mundo são realizados em amostras de secreções do trato respiratório, sendo a maior parte destas provenientes de crianças com sintomas de ITRI. A Infecção Respiratória Aguda (IRA) é uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Aproximadamente 4 milhões pessoas morrem anualmente com ITRI, tornando assim um dos principais problemas de saúde pública (CHOW et al., 2009). Os estudos mostram taxas de prevalência que variam de 1,5% a 1,9%, fato que pode estar relacionado a diferentes fatores como: população estudada, técnicas de amostragem e sensibilidade dos ensaios (ALLANDER et al., 2008). No Brasil, na cidade de Belém, um estudo para detectar a presença de HBoV em pacientes de 0 a 2 anos com IRA teve uma porcentagem relativamente baixa, com 0,76% de detecção (SILVA, et al., 2010). Já em Porto Alegre houve um percentual maior de 13,2% em crianças com até dois anos de idade (LEON et al., 2013). Na Argentina a prevalência foi de 21,5% para crianças com até cinco anos

de idade (GHIETTO et al., 2011). Esses resultados mostram que a ocorrência de HBoV está relacionada fortemente a pacientes jovens e sugerem que provavelmente existe uma grande concentração do HBoV relacionado a IRA na região Sul da América. Em outros países também existe uma grande frequência de detecção do HBoV em pacientes que sofrem com doenças respiratórias: Austrália, 15%; Alemanha, 87%, Jordânia, 57%, Tailândia, 53%, dentre outros países (BI et al., 2007).

Assim como IRA, a Gastroenterite Aguda também é uma patologia relevante e tem contribuído com os elevados índices de morbidade e mortalidade infantil em todo mundo, sendo responsável por aproximadamente dois a três milhões de mortes por ano (KHAMRIN et al., 2012b). Após seu primeiro registro em fezes, ocorrido em 2007 na Espanha (VICENTE et al., 2007), o HBoV passou a ser detectado em amostras fecais de crianças com sintomas gastrointestinais em várias partes do mundo, podendo variar o percentual de detecção em 2,7% (China), 9,1% (Irã) e 12,5% (Coréia do Sul) em países orientais e 10,6% (Paraguai), 19,3% (Chile) e 81% (Estados Unidos) em países ocidentais (ZHAO et al., 2012; ROMANI et al., 2013; KIM et al., 2010; MODENA et al., 2013; LEVICAN et al., 2013; BLINKOVA et al., 2009). No Brasil, tem reportes deste agente etiológico em estudos realizados nas cidades de Goiânia, Campo Grande e Brasília, onde as amostras de fezes de crianças menores de 5 anos, com sintomas de gastroenterite, foram analisadas com 5%, 6.5% e 6.9%, respectivamente, sem notificação de sintomas respiratórios nas amostras positivas de HBoV (SOUZA et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a presença e quantificar a prevalência do HBoV em amostras de fezes de crianças menores de 5 anos de idade internadas com quadro clínico de gastroenterite aguda na

emergência de uma Unidade Hospitalar da cidade de Salvador no período de janeiro a julho de 2012.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Identificar o HBoV em amostras de fezes.
- 2- Testar a detecção de NoV, HRV e AdV.
- 3- Caracterizar as espécies de HBoV através do sequenciamento e análise filogenética.
- 4- Analisar comparativamente a incidência de HBoV e outras viroses gastrointestinais como NoV, HRV e AdV.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

A pesquisa foi conduzida a partir de 105 amostras de fezes provenientes de pacientes atendidos em um hospital da rede hospitalar da cidade de Salvador, estado da Bahia. A população alvo para esse estudo foi de crianças menores de cinco anos de idade, de ambos os sexos, com quadro clínico de gastroenterite aguda, disponível no período de Janeiro a Julho de 2012.

As amostras de fezes coletadas desses indivíduos foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia (ICS – UFBA) para seu armazenamento a -20°C até a realização da análise proposta.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Salvador sob protocolo número 04.11.12. FR: 345422.

4.2 DETECÇÃO DE NoV, HRV e AdV

Para detectar a presença de NoV, AdV e HRV, foram utilizados testes imunoenzimáticos como ELISA: RIDASCREEN® 3ª geração Norovírus (R-Biopharm, Alemanha) para NoV, RIDASCREEN® Adenovírus (R-Biopharm, Alemanha) para AdV e RIDASCREEN® Rotavírus (R-Biopharm, Alemanha) para HRV e também cromatografia: VIKIA® Rota-Adeno (bioMérieux®) para identificação de HRV e AdV, assim como o RIDA®QUICK (R-Biopharm) para o NoV.

4.3 DETECÇÃO DO HBoV

4.3.1 Extração do DNA viral

Antes de iniciar a extração do DNA viral, cerca de 350 μL de cada amostra de fezes foi diluída em 350 μL de tampão salino fosfato (PBS). Em seguida, as suspensões foram homogeneizadas e depois centrifugadas a uma rotação de 8000 RPM por um minuto, formando um sobrenadante que seria utilizado na reação de extração do material genético viral do HBoV. Para realizar a extração foi utilizado o kit da QIAamp DNA (QIAGEN, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.2 Nested-PCR

Após o processo de extração, o DNA foi submetido à técnica de nested-PCR. Para essa reação foram utilizados primers para amplificar a região parcial do gene que codifica as proteínas estruturais VP1/VP2, tanto do HBoV1 quanto HBoV2 (**Tabela 1**) (KAPOOR *et. al.*, 2010). Na primeira amplificação foram utilizados 8µL do DNA, 25 µL da solução mastermix green (Promega, USA), 1 µL do primeiro par de primers (AK-VP-F1 e AK-VP-R1) e 16 µL de água, formando uma solução final de 50 µL. Na segunda amplificação (nested-PCR) foram utilizados os seguintes primers: AK-VP-F2 e AK-VP-R2. Cada amplificação foi realizada em duas etapas. A primeira etapa ocorreu da seguinte maneira: 10 ciclos de 95°C por 35 segundos, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, com uma diminuição de 0,5°C na temperatura de anelamento, antes de recommençar cada ciclo; a segunda etapa: 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 54°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, seguida de uma extensão final de 72°C por 10 minutos. A segunda amplificação ocorreu em condições similares à primeira, modificando apenas as temperaturas de anelamento que foram alteradas para 60°C na primeira e 58°C na segunda etapa da reação.

Tabela 1 Primers utilizados no estudo.

Primers externos (Primeira amplificação)	Primers internos (Nested-PCR)
AK-VP-F1 (CGCCGTGGCTCCTGCTCT)	AK-VP-F2 (GGCTCCTGCTCTAGGAAATAAAGAG)
AK-VP-R1 (TGTTCCGCATCACAAAAGATGTG)	AK-VP-R2 (CCTGCTGTTAGGTCGTTGTTGTATGT)

4.3.3 Eletroforese em gel de agarose

Uma fração de 10µL do produto amplificado no nested-PCR foi aplicada no gel de agarose a 2% . Esse gel foi submetido à eletroforese por aproximadamente 40 minutos em uma

cuba horizontal contendo tampão TRIS/BORATE/EDTA (TBE), 1x concentrado. Posteriormente o mesmo foi submerso em brometo de etídio (10 µg/ml) por 20 minutos e em seguida visualizado em um transluminador de luz ultravioleta onde o produto amplificado apresentou um tamanho de 576 pb.

4.4 SEQUENCIAMENTO E CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA

Os fragmentos de DNA foram purificados a partir do gel de agarose, utilizando o kit de purificação da QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante e depois armazenado no freezer a -80 °C. As amostras purificadas foram enviadas para o Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) para serem sequenciadas. Nessa instituição foi utilizado o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* 5'-TGTTTCGCCATCACAAAAGATGTG-3' e 2 µL do reagente *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70 %. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no seqüenciador automático. Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v 1.0.1* (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set "Z"*; *Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"*; *BioLIMS Project "3100_Project1"*; *Run Module 1 "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"*; e *Analysis Module 1 "BC-3100SR_Seq_FASTA.saz"*.

A árvore filogenética foi construída utilizando o método de Máxima Verossimilhança que selecionou o filograma com maior probabilidade, segundo o modelo de evolução molecular. Para identificar as espécies das sequências geradas no presente estudo, foram utilizadas cepas de trabalhos descritos na literatura obtidos no GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) (**Quadro 1**). As sequências foram alinhadas utilizando o programa computacional CLUSTAL W que, juntamente com o programa de edição de sequências, o BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), proporcionaram a análise de homologia entre as mesmas. Após o alinhamento e edição das sequências, estas foram utilizadas para inferência

filogenética usando o tipo de árvore Neighbor-joining, método Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G), incluído no software Mega 6.0 (<http://www.megasoftware.net/mega.php>). As 10 sequências parciais do gene que codifica a proteína VP1/VP2 foram depositadas no banco de dados GenBank do NCBI com os números de acesso KM366083-KM366092.

Número de Acesso No GenBank	Procedência (país)	Espécie
AB763337	Turquia	HBoV-2A
AB763338	Turquia	HBoV-2A
GQ243639	Estados Unidos	HBoV-2A
FJ973559	Nigéria	HBoV-2B
FJ973560	Nigéria	HBoV-2B
GQ506568	Nigéria	HBoV-4
FJ973561	Nigéria	HBoV-4
GQ506590	Nigéria	HBoV-4
JQ267789	Tailândia	HBoV-4
AB761088	Bangladesh	HBoV-3
AB763342	Turquia	HBoV-3
HQ871672	China	HBoV-3
FJ948861	Austrália	HBoV-3
EU918736	Austrália	HBoV-3
HQ871548	China	HBoV-1
JQ267774	Tailândia	HBoV-1
HQ871577	China	HBoV-1
KC544963	Argentina	HBoV-1
KJ634207	Argentina	HBoV-1

Quadro 1: Cepas de HBoV selecionadas no GenBank de acordo com a espécie e procedência.

5 RESULTADOS:

5.1 OCORRÊNCIA DE HBOV

Para realizar a detecção do HBOV, foram analisadas 105 amostras de fezes de crianças com sintomas de gastroenterite aguda, atendidas no serviço de emergência pediátrica de uma unidade hospitalar da cidade de Salvador. Observou-se que, após a realização da técnica de Nested-PCR, 42% (44 pacientes) das amostras apresentaram resultado positivo para HBOV, enquanto 58% (61 pacientes) tiveram resultado negativo. O fragmento de 576 pares de bases foi amplificado no caso das amostras positivas (**Gráfico 1**).

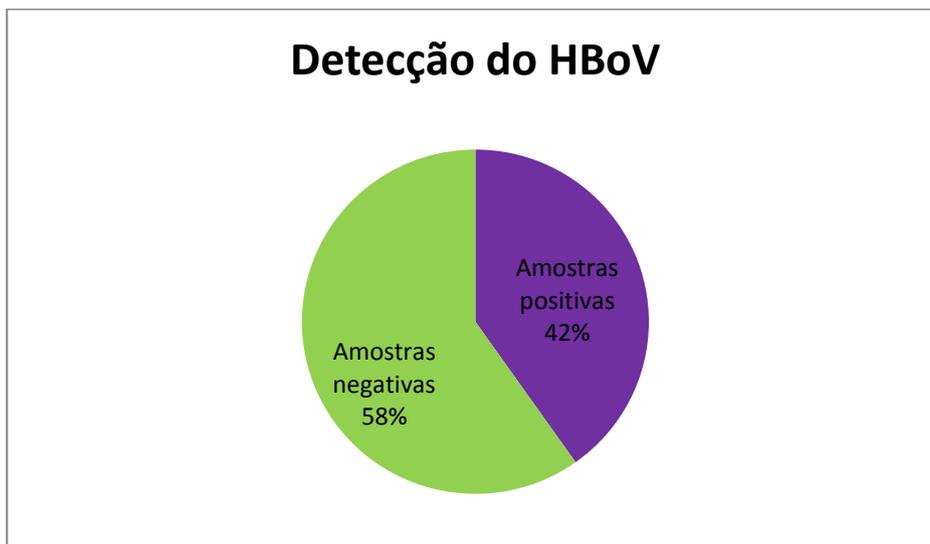


Gráfico 1: Resultado das amostras de fezes de crianças analisadas pela técnica de nested-PCR para a detecção de HBOV.

Analisando a faixa etária (0 a 60 meses) dos pacientes com gastroenterite aguda, verificou-se que houve um maior número de resultados positivos para HBOV entre as crianças de 7 a 23 meses de idade, representadas por 47,72% (21 pacientes), seguidas por outras com 24 a 35 meses, com 15,9 % (7 pacientes), e, em menor quantidade, crianças de 36 a 47 meses e 48 a 60 meses, ambas com 13,6% (6 pacientes) e crianças jovens de 0 a 6 meses com 9% (4 pacientes) (**Tabela 2**).

Tabela 2 Distribuição dos pacientes positivos para HBoV em relação à sua faixa

Faixa etária	Número de pacientes	%
0-6 meses	4	9,09
7-23 meses	21	47,72
24-35 meses	7	15,90
36-47 meses	6	13,66
48-60 meses	6	13,66

5.2 OCORRÊNCIA DE NOV, ADV E HRV

A presença de NoV, AdV e HRV, foi detectada através de testes imunoenzimáticos em amostras fecais provenientes de crianças com gastroenterite aguda. Do total de 105 amostras analisadas, 27 (26%) tiveram resultado positivo para os vírus, enquanto 78 (74%) não apresentaram resultado positivo para infecção viral pela metodologia utilizada. A distribuição da presença viral se deu da seguinte maneira: 20 amostras (19%) infectadas por NoV, 3 (3%) por AdV, 3 (3%) por HRV e uma amostra (1%) com infecção mista entre AdV e HRV (**Gráfico 2**).

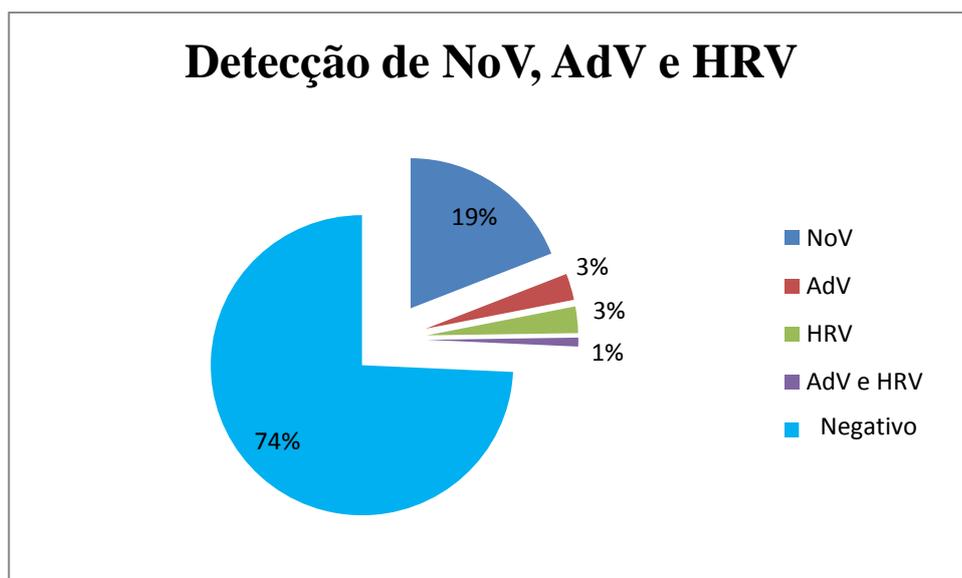


Gráfico 2: Distribuição das viroses entéricas: NoV, AdV e HRV detectadas em crianças por testes imunoenzimáticos.

Na tabela 3 estão representados os resultados das faixas etárias das crianças com gastroenterite aguda com detecção positiva para NoV, AdV e HRV. Observa-se que houve uma maior detecção para os três vírus (inclusive a co-infecção) nas crianças de 0-23 meses, destacando-se a presença única de HRV nessa faixa etária. Por outra parte, observa-se que NoV foi detectado em quase todas os grupos de idade com exceção de 48-60 meses na qual também não foi detectada a presença dos outros vírus. No caso de AdV, das quatro amostras positivas, três corresponderam a faixa etária de 0-23 meses (**Tabela 3**).

Tabela 3 Distribuição da idade dos pacientes positivos para NoV, AdV e HRV.

Faixa etária	N pacientes NoV	N de pacientes AdV	N de pacientes HRV	AdV+HRV
0-23 meses	16	3	3	1
24-35 meses	3	-	-	-
36-47 meses	1	1	-	-
48-60 meses	-	-	-	-

5.3 HBOV E CO-INFECÇÃO

Observou-se que do total das 44 amostras fecais de pacientes com resultado positivo para HBoV, 12 (27%) pacientes apresentaram co-infecção, enquanto 32 (73%) estavam infectados apenas por HBoV. Dentre os pacientes com co-infecção (n=12), houve maior destaque para o NoV, o qual foi encontrado em associação com HBoV em 91,6 % (11 de 12 pacientes co-infectados), seguido por AdV, que estava presente em apenas 8,4 % (1 de 12 pacientes co-infectados). Em nenhuma amostra positiva para HBoV foi encontrada associação com mais de um vírus (**Gráfico 3**).

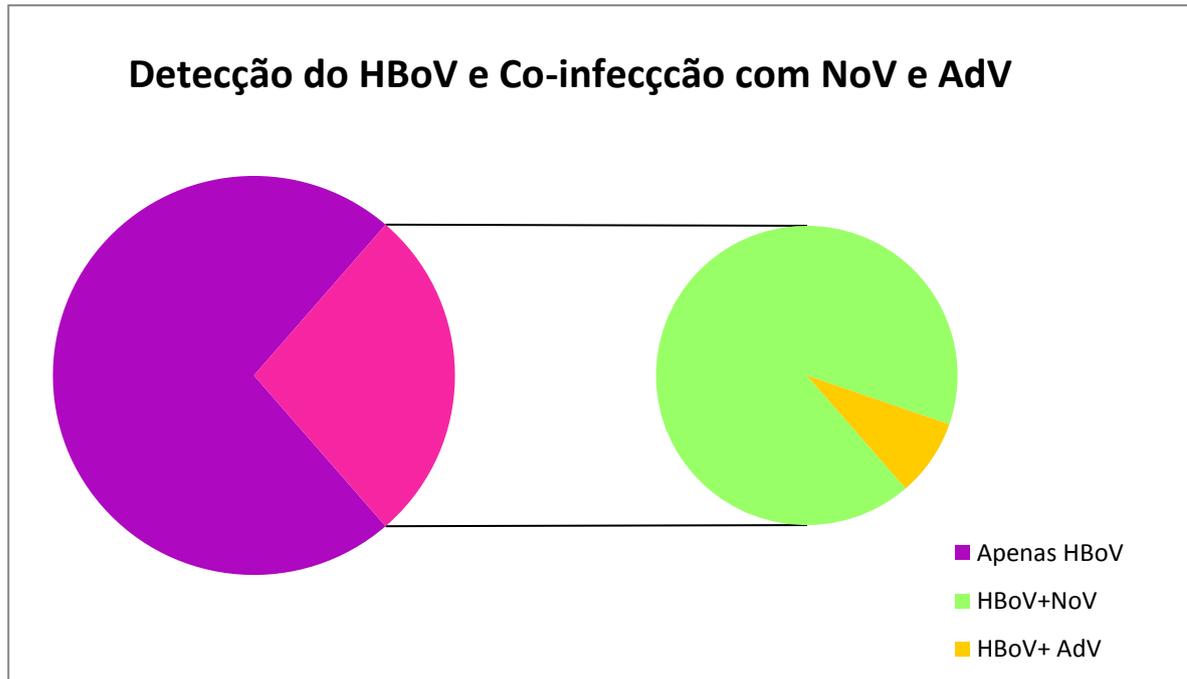


Gráfico 3: Distribuição das co-infecções com NoV e AdV em amostras de fezes positivas para HBoV em crianças.

5.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Das 44 amostras com resultado positivo para HBoV, as 10 que apresentavam bandas mais definidas foram escolhidas para o sequenciamento e construção da árvore filogenética (figura 4) de máxima verossimilhança (-lnL= -1780.609). Esse procedimento foi realizado utilizando o modelo de substituição Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G) e confiabilidade estimada pelo método de *bootstrap* com 1.000 pseudo-replicas. Através da construção e da análise dessa árvore foi possível identificar as espécies de cada uma das amostras sequenciadas.

De acordo com essa análise foi possível observar a formação dois clados: o superior, contendo subdivisões identificadas pelas cepas de HBoV-2 (A e B), HBoV-3 e HBoV-4 e o clado inferior, que não sofreu subdivisões, contendo apenas as cepas de HBoV-1 (figura 4). Do total das 10 amostras sequenciadas, 7 foram filogeneticamente relacionadas a espécie HBoV-2A: cepas KM366092, KM366089, KM366085, KM366084, KM366090, KM366091 e KM366083 e 3 amostras à espécie HBoV-1: cepas KM366088, KM366086 e KM366087. As sequências de HBoV foram comparativamente analisadas com cepas de referência do GenBank provenientes de países distintos, dentre eles: Tailândia, Argentina, China, Bangladesh, Turquia, Nigéria e Estados Unidos (**Figura 5**).

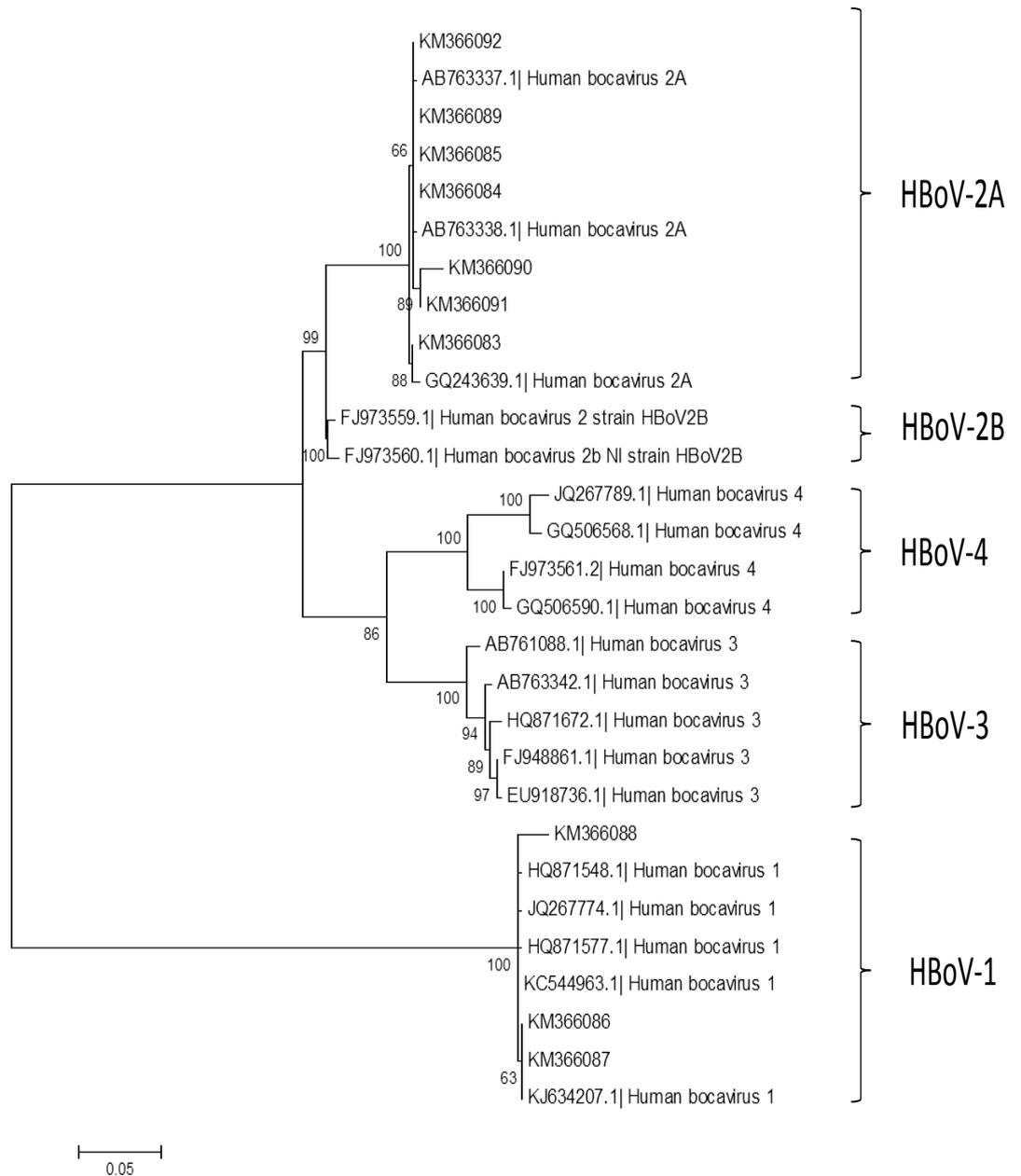


Figura 5: Árvore filogenética do tipo Neighbor-joining construída pelo método Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G), *bootstrap* de 1000 réplicas, a partir das sequências parciais da região do gene que codifica a poliproteína VP1-VP2 do HBoV.

6 DISCUSSÃO

A gastroenterite aguda é considerada uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade em crianças em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento (PATEL et al., 2008). Sua etiologia é diversificada e vem sendo representada principalmente por agentes virais, dentre os quais se destacam: HBoV, NoV, AdV e HRV (CHOW et al., 2010; JARTTI et al., 2012; RIMOLDI et al., 2011).

Desde que foi identificado pela primeira vez em 2005 até os dias atuais, estudos tem sido realizados na tentativa de estabelecer relações de tropismo e patogenicidade do HBoV em seu hospedeiro. Após ter sido descoberto em amostras de aspirados nasofaríngeos de crianças com infecção do trato respiratório inferior, o HBoV também passou a ser encontrado em fezes de pacientes com gastroenterite aguda, mostrando a capacidade que o vírus tem de se desenvolver tanto no sistema respiratório, como no sistema gastrointestinal (ALLANDER et al., 2005; VICENTE et al., 2007; KAPOOR et al., 2009).

Até o momento poucos trabalhos relacionando a ocorrência do HBoV à infecção gastrointestinal em crianças, no Brasil, foram publicados. Do total de amostras analisadas pelo presente estudo, 42% apresentaram resultado positivo, um percentual de detecção por HBoV acima do que é normalmente relatado em outros estados, como no Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2010), onde apenas 2% das amostras analisadas apresentaram positividade e na região Centro-oeste, na qual a média de detecção variou de 5% em Goiânia (1988 a 2002) a 6,9% em Brasília (1998-2002) (SOUZA et al., 2012). Alguns países também relatam baixa detecção, como Japão, Irã, Itália, China e Estados Unidos (KHAMRIN et al., 2012a; CASHMAN et al., 2012; RIMOLDI et al., 2011; ZHAO et al., 2012; CHOW et al., 2010). Em contrapartida, resultados mais recentes assemelham-se aos dados encontrados neste estudo que foram observados no Chile e Bangladesh, onde os percentuais de detecção apresentaram índices de 19,3% e 63%, respectivamente (MITUI et al., 2014). Possivelmente, os diferentes percentuais apresentados nos estudos anteriores estejam relacionados a variação da metodologia empregada para detectar a presença do HBoV, como no caso da escolha dos primers que amplificam as regiões alvo do DNA viral (KHAMRIN et al., 2012a). Como foi revelado por Kapoor e colaboradores em 2010, a identificação de múltiplas espécies (HBoV-1, HBoV-2, HBoV-3 e HBoV-4) a partir de dois pares de primer, seria amplamente vantajosa. O uso destes primers, denominados Panbocavírus, para a análise da amostragem da cidade de Salvador, diferente do que foi utilizado nas regiões Centro Oeste e Sul do Brasil (DIVINA et al, 2010; SOUZA et al., 2012), permitiu que duas espécies fossem identificadas, HBoV-1 e HBoV-2A. A espécie HBoV-2A, até o momento, nunca havia sido reportada no país. Embora o HBoV-1 tenha sido a primeira espécie a ser detectada, a patogenia do vírus em pacientes com gastroenterite aguda

ainda não está clara. Originalmente descoberto em secreções de pacientes com infecção respiratória, estudos apontam que após a infecção primária, o HBoV-1 pode persistir de forma assintomática no organismo por vários meses e após ser deglutido, afetar o trato entérico (LEVICAN et al., 2013; MODENA et al., 2013). Por outro lado, HBoV-2 e HBoV-3, que são frequentemente detectados em amostras de indivíduos com sintomas gastroentéricos, raramente são encontradas em pacientes com infecção respiratória (CHIEOCHANSIN et al., 2010; CHOW et al., 2010; WANG et al., 2011; ARTHUR et al., 2009; HAN et al., 2009). Já a espécie HBoV-4, que também é vista em pacientes com gastroenterite, possui poucos registros no mundo (LAU et al., 2007; ARTHUR et al., 2009).

A faixa etária dos pacientes infectados é um fator relevante, considerando que a maioria dos estudos demonstram uma elevada incidência de infecção por HBoV entre crianças e pouco relato em adultos (CHOW et al., 2008; CASHMAN et al., 2012; LEVICAN et al., 2013; ROMANI et al., 2013). Nesse estudo, foi possível observar uma alta frequência de infecção por HBoV entre pacientes menores de 2 anos de idade, similar ao informado por muitos autores. No entanto, crianças na faixa etária de 0 a 6 meses possuem poucos registros, fato que pode ser explicado pela presença de anticorpos maternos adquiridos durante o período de amamentação (SOUZA et al., 2012; YU et al., 2008; MODENA et al., 2013; BLINKOVA et al., 2009). Outro fator também importante é a co-infecção entre HBoV e patógenos virais, como NoV, HRV e AdV, encontrado em pacientes com gastroenterite aguda, fato frequentemente relatado na literatura (JARTTI et al., 2012; ARTHUR et al., 2009; HAN et al., 2009). Nesse estudo, pode-se observar que a maior parte das amostras positivas para HBoV tratava-se de infecção única do vírus, enquanto, número menor eram referentes a co-infecção com NoV (mais frequente) e AdV. Em um estudo realizado no Rio de Janeiro também foi observada tal situação, onde co-infecção com NoV, AdV e HRV estava presente em 21,4% das amostras (ALBUQUERQUE et al., 2007). Na literatura mundial alguns autores mostram uma situação contrária, onde a co-infecção é predominantemente maior que a mono-infecção. Nesses casos de co-infecção, assim como em grande parte dos estudos, o NoV também foi encontrado em maior número que o AdV, mostrando assim sua relevância perante os outros agentes virais (KHAMRIN et al., 2012a; WANG et al., 2011).

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que o HBoV é um importante patógeno viral de gastroenterite aguda em crianças no município de Salvador. A alta taxa de detecção aqui encontrada é motivo de preocupação e exige maior atenção a respeito para este agente ainda pouco estudado. Nesse sentido faz-se necessária alertar os profissionais da medicina pediátrica sobre a presença deste vírus, como também a inclusão de testes

direcionados à detecção de HBoV na rotina dos laboratórios dos hospitais de Salvador. Desta forma pretende-se mostrar a importância de continuar os monitoramentos epidemiológicos das gastroenterites que afetam a comunidade para colaborar com controle e prevenção das doenças que afetam crianças da primeira infância.

7 CONCLUSÃO

- O HBoV demonstrou ser uma agente etiológico de importância nos quadros clínicos de gastroenterite aguda em crianças menores de 5 anos de idade.
- A utilização dos primers Panbocavirus, que até o momento ainda não haviam sido utilizados em estudos no Brasil para detecção de HBoV, possibilitou a identificação das espécies HBoV-1 e HBoV-2A
- O HBoV-2A identificado no estudo é uma espécie que não havia sido relatada até o momento no Brasil.
- O estudo mostrou que pacientes com 0 a 2 anos de idade são mais suscetíveis a contrair o HBoV.
- O HBoV foi detectado na maior parte dos casos como único patógeno da doença nesses pacientes.
- A co-infecção do HBoV com outros vírus gastrointestinais, como NoV e AdV, ocorreu em menor número.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M.C.M; ROCHA, N.L.; BENATI, J.F.; SOARES, C.C.; MARAHÃO, G.A.; RAMÍREZ, L.M.; ERDMAN, D.; SANTOS, N. Human Bocavirus Infection in Children with Gastroenteritis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, (11), p. 1756-1757, 2007.

ALLANDER, T.; TAMMI, M.T.; ERIKSSON, M.; BJERKNER, A.; TIVELJUNG-LINDELL, A.; ANDERSON, B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p.12891-12896, 2005.

ALLANDER, T.; JARTTI, T.; GUPTA, S.; NIESTERS, H.G.; LEHTINEN P.; OSTERBACK, R.; VUORINEN, T.; WARIS, M.; BJERKNER, A.; TIVELJUNG-LINDELL, A.; VAN DEN HOOGEN, B.G.; HYYPIA, T.; RUUSKANEN, O. Human Bocavirus and Acute Wheezing in Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p.904-910, 2007.

ARTHUR, J.L.; HIGGINS, G.D.; DAVIDSON, G.P.; GIVNEY, R.C.; RATCLIFF, R.M. A NOVEL. Bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. **PLoS Pathogens**, v.5, e 100039, 2009.

BASTIEN, N.; BRANDT, K.; DUST, K.; WARD, D.; LI, Y. Human Bocavirus Infection, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 5, 2006.

BERNS, K.; PARRISH, C.R. Parvoviridae. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds), **Fields Virology**, Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; Philadelphia p.2437, 2007.

BI, Z.; PIERRE, B. H.; FORMENTY and CATHY E. R. Human bocavirus, a real respiratory tract pathogen.. **African Journal of Microbiology Research**, p. 051-056, 2007.

BOSIS, S.; ESPOSITO, S.; NIESTERS, H.G.; et al. Role of respiratory pathogens in infants hospitalized for a first episode of wheezing and their impact on recurrences. **Clin Microbiol Infect.** v. 14 (7), p 677-8, 2008.

BLINKOVA, O.; ROSARIO, K.; LI, A.; KAPOOR, A.; SLIKAS, B.; BERNARDIN, F.; BREITBART, M.; DELWART, E. Frequency Detection of Highly Diverse Variants of

Cardiovirus, Cosavirus, Bocavirus, and Circovirus in Sewage Samples Collected in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 3507-3513, 2009.

CAMPOS,S.G.; SARDI I.S; SAMPAIO,S.A.; MELLO, B.B.V. Detection of human rotavirus in hospitalized children with diarrhea episodes in Salvador, Bahia, Brazil.**R. Ci. Méd. Biol.**, v. 1, n. 1, p. 7-11, 2002.

CAMPOS, G.S.; MOREAU, V.H.;BANDEIRA, A.; ALMEIDA, P.F.; AMADOR, D.M.; LIMA, M.O.; SARDI, S.I. Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. **Archives of Virology**, p. 1125-1129, 2008.

CASHMAN, O.; O'SHEA, H. Detection of human bocaviruses 1, 2 and 3 in Irish children presenting with gastroenteritis. **Arch Virol**, v. 157, p. 1767–1773, 2012.

CHIEOCHANSIN, T.; SIMMONDS, P.; POOVORAWAN, Y. Determination and analysis of complete coding sequence regions of new discovered human bocavirus types 2 and 3. **Arch Virol**, v.155, p. 2023–2028, 2010.

CHOW, B.D.; HUANG, Y.T.; ESPER, F.P..Evidence of human bocavirus circulating in children and adults, Cleveland, Ohio. **Journal of Clinical Virology**, v.43, p. 302-306, 2008.

CHOW, M. D. BRIAN, D.W.; FRANK, P.; ESPER, M.D. The Human Bocaviruses: A Review and Discussion of Their Role in Infection. **Clin Lab Med**, v. 29, p.695-713, 2009.

CHOW, W. D. B.; OU. Z; ESPER, P.F. Newly recognized bocaviruses (HBoV,HBoV2) in children and adults with gastrointestinal illness in the United States. **Journal of Clinical Virology**, v. 47, p. 143-147, 2010.

CORCIOLI, F.; ZAKRZEWSKA, K.; FANCI, R.; DE GIORGI, V.; INNOCENTI, M.; ROTELLINI, M.; DI LOLLO, S.; AZZI, A. Human parvovirus PARV4 DNA in tissues from adult individuals: a comparison with human parvovirus B19 (B19V). **Virol J Oct**, v. 15, p. 7:272, 2010.

CRAWFORD, J. M. et al.; O Trato Gastrointestinal in: COTRAN, R. S.; KUMAR, EV.; COLLINS, T.; **Robbins-Patologia Estrutural e Funcional**, 6ed., Editora Guanabara Koogan S.A., 18:698-727, 2000.

FABBIANI, M.; TERROS, C.; MARTORELLI, B.; VALENTINI, M.; BERNINI, L.; CELLESI, C.; CUSI, G.M. Epidemiological and Clinical Study of Viral Respiratory Tract Infections in Children From Italy. **Journal of Medical Virology**, v. 81 p. 750–756, 2009.

GARBINO, J.; INOUBLI, S.; MOSSDORF, E.; WEBER, R.; TAMM, M.; SOCCAL, P.; AUBERT, J.D.; BRIDEVAUX, O.P.; TAPPAREL, C.; KAISER L. Respiratory viruses in HIV-infected patients with suspected respiratory opportunistic infection. **AIDS** v. 22, p.701–705, 2008.

GARCÍA-GARCÍA, M.L.; CALVO, C.; POZO, F. PÉREZ-BREÑA P.; VÁZQUEZ, M.C.; CASAS, I. Detection of human bocavirus in ill and healthy spanish children a 2-year study. **ADC Online First**, 2008.

GHIETTO, L.M.; CÁMARA, A.; ZHOU, Y.; PEDRANTI, M.; FERREYRA, S.; FREY, T.; CÁMARA, J.; ADAMO, M.P. High prevalence of human bocavirus 1 in infants with lower acute respiratory tract disease in Argentina, 2007-2009. **Braz J Infect Dis**, v.16 (1), p. 38-44, 2012.

GREEN, K. Y. *Caliciviridae: The Noroviruses*. In: Knipe DM, Howley PM, **Fields Virology**, ed.5, Lippincott Williams & Wilkins, p.949-980, 2007.

GURDA, L.B.; PARENT, K.N.; BLADEK, H.; SINKOVITS, R.S.; DIMATTIA, A.M.; RENICE, C.; CASTRO, A.; MCKENNA, R.; OLSON, N.; BROWN, K.; BAKER, T.S.; AGBANDJE-MCKENNA, M. Human Bocavirus Capsid Structure: Insight into the Structural Repertoire of the *Parvoviridae*. **J. Virol**, v. 84, n. 12, p. 5880, 2010.

HAN, T.H.; KIM, C.H.; PARK, S.H.; KIM, E.J.; CHUNG, J.Y.; HWANG, E.S. Detection of Human Bocavirus-2 in children with acute gastroenteritis in South Korea. **Arch Virol**, v. 154, p. 1923-1927, 2009.

JACQUES, J.; MORET, H.; RENOISA, F.; LÉVÊQUE, N.; MOTTE, J.; ANDRÉOLETTI, L. Human Bocavirus quantitative DNA detection in French children hospitalized for acute bronchiolitis. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, p. 142–147, 2008.

JARTTI, T.; HEDMAN, K.; JARTTI, L.; RUUSKANEN, O.; ALLANDER, T.; SÖDERLUND-VENERMO, M. Human bocavirus-the 5 first years. **Rev. Med. Virol.** v. 22, p. 46–64, 2012

KAPOOR, A.; SLIKAS, E.; SIMMONDS, P.; CHIEOCHANSIN, T.; NAEEM A; SHAUKAT, S.; ALAM, M.M.; SHARIF, S.; ANGEZ, M.; ZAIDI, S.; DELWART, E. A new bocavirus species in human stool. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, p. 198-200, 2009.

KAPOOR, A.; SIMMONDS, P.; SLIKAS, E.; LI, L.; BODHIDATTA, L.; SETHABUTR, O.; TRIKI, H.; BAHRI, O.; ODERINDE, B.S.; BABA, M.M.; BUKBUK, D.N.; BESSER, J.; BARTKUS, J.; DELWART, E. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, p.1633-1643, 2010.

KHAMRIN, P.; MALASAO, R.; CHAIMONGKOL, N.; UKARAPOL.N.; KONGSRICHAROERN, T.; OKITSU, S.; HAYAKAWA, S.; USHIJIMA.H. Circulating of Human Bocavirus 1,2,3 and 4 I pediatric patients with Acute Gastroenteritis in Thailand. **Infection, Genetics and Evolution.** v. 12 (3), p. 565-9, Janeiro, 2012 a.

KHAMRIN. P.; THONGPRACHUM, A.; SHIMIZU, H.; OKITSU, S.; MIZUGUCHI, A.; HAYAKAWA, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. Detection of Human Bocavirus 1 and 2 From Children With Acute Gastroenteritis in Japan. **Journal of Medical Virology**, v. 84, p. 901-905, February, 2012 b.

KING, C.K.; GLASS, R.; BRESCE, J.S.; DUGGAN, C. Managing acute gastroenteritis among children: oral rehydration, maintenance and nutritional therapy. **MMWR**, v.52, p. 1-16, 2003.

KIN, S. Prevalence of human bocavirus 1 among people without gastroenteritis symptoms in South Korea between 2008 and 2010. **Arch Virol**, 2014.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, L.R. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, p. 197-204, 2003.

LENNON, G.; CASHMAN, O.; LANE, K.; CRYAN, B.; O'SHEA, H. Prevalence and Characterization of Enteric Adenoviruses in the South of Ireland. **Journal of Medical Virology**, v. 79, p. 1518–1526, 2007.

LEVICAN, J.; NAVAS, E.; ORIZOLA, J.; AVENDAÑO, L.F.; GAGGERO, A. Human bocavirus in children with acute gastroenteritis, Chile, 1985-2010. **Emerg Infect Dis.** v. 19, n. 11, p. 1877-80, 2013

LAU, S.K.; YIP, C.C.; QUE, T.L.; LEE, R.A.; AU-YEUNG, R.K.; ZHOU, B.; SO L.Y.; LAU, Y.L.; CHAN, K.H.; WOO, P.C.; YUEN, K.Y. Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. **J Infect Dis**, 196:986-993, 2007.

LOVERIDGE, P.; COOPER, D.; ELLIOT, A.J.; HARRIS J.; GRAY J.; LARGE, S.; REGAN M.; SMITH, G.E.; LOPMA, B. Vomiting Calls to NHS Direct Provide an Early Warnig of Norovirus Outbreaks in Hospitals. **Journal of Hospital Infection**, v. 74, p. 385-393, 2010.

MITUI, M.T.; BOZDAYI, G.; AHMED, S.; MATSUMOTO, T.; NISHIZONO, A.; AHMED, K. Detection and molecular characterization of diarrhea causing viruses in single and mixed infections in children: a comparative study between Bangladesh and Turkey. **Journal of Medical Virology**, v. 86, p. :1159–1168, 2014.

MODENA, P.L.J.; MARTINEZ, M.; AMARILLA, A.A.; ESPÍNOLA, E.E.; GALEANO, M.E.; FARIÑA, N.; RUSSOMANDO, G.; AQUINO, H.V.; PARRA. I.G.; ARRUDA, E. Viral load of human bocavirus-1 in stools from children with viral diarrhoea in Paraguay. **Epidemiol Infect**, v.141, p.2576–2580, 2013.

MOTAMEDIFAR, M.; AMINI, E.; TALEZADEH SHIRAZI, P. Frequency of rotavirus and adenovirus gastroenteritis among children in shiraz, iran. **Iran Red Crescent Med J**, v. 15 (8), p. 729-33, 2013.

PATEL, M.M.; WIDDOWSON, M.A.; GLASS, R.I.; AKAZAWA K.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U.D. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. **Emerg Infect Dis**, v. 14, p. 1224-1231, 2008.

QU, X.W.; LIU, W.P.; QI, Z.Y.; DUAN, Z.J.; ZHENG, L.S.; KUANG, Z.Z. Phospholipase A2-Like activity of human bocavirus VP1 unique region. **Biochem Biophys**, v. 365: 158-163, 2008.

RIMOLD, G.S.; STEFANI, F.; PAGANI, C.; CHEAL, L.L.; ZANCHETTA, N.; BARTOLO, D.I.; ALESSANDRA L.; RUGGERI, M.F.; LILLO, D.D.; ZUCCOTTI, V.G.; GISMONDO, R.M. Epidemiological and Clinical Characteristics of Pediatric Gastroenteritis Associated with New Viral Agents. **Arch Virol**. v. 156, p. 1583-1589, 2011.

RODRIGUES, F.; ALVES, C.M.; ALVES, F.A.; LEMOS, L. Etiologia das gastroenterites agudas em Unidade de Internamento de Curta Duração: estudo prospectivo de 12 meses. **Acta Pediatr Port**, v. 38 (1), p. 13-7, 2007.

ROMANI, S.; MOHEBBI, S.R.; KHANYAGHMA M.; AZIMZADEH P.; BOZORGI, S.M.; DAMAVAND B.; JADALI F. Detection of Human Bocavirus 1, 2 and 3 from patients with acute gastroenteritis. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench**, v. 6 (Sppl 1), p. S77-S81, 2013.

SAMUELSON, J. et al.; Doenças Infecciosas in: COTRAN, R. S.; KUMAR, EV.; COLLINS, T.; **Robbins-Patologia Estrutural e Funcional**, 6ed., Editora Guanabara Koogan S.A., 9:296-321, 2000.

SANTOS,N.; VOLOTÃO, E.M.; SOARES, C.C.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I.; HOSHINO, Y. Predominance of Rotavirus Genotype G9 during the 1999, 2000 e 2002 Seasons among Hospitalized Children in the City of Salvador, Bahia, Brazil: Implications for future vaccine Strategies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.8, p. 4064-4069, 2005.

SANTOS, N.; PERET, T.C.T.; HUMPHREY, D.C.; ALBUQUERQUE M.C.M; SILVA, C.R; BENATI, J.F.; LU, X.; ERDMA, D.D. Human Bocavirus Specie 2 and 3 in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 48, p. 127-130, 2010.

SCHILDGEN, O.; MULLER, A; ALLANDER, T.; MACKAY, I.M.; VÖLZ, S.; KUPFER, B.; SIMON, A. Human Bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections. **Clinical Microbiology Review**, v.21, p. 291-304, 2008.

SERRAVALLE, K.; SANTOS, N.; SARDI I.S.; SILVA, S.P.S.; JUNIOR R.C.H.; MATTOS, P.A.; CAMPOS, S.G. Molecular Characterization of Group A Rotavirus Isolates Obtained from Hospitalized Children in Salvador, Bahia, Brazil. **BJID**, v.11, n.1, p.35-39, 2007.

SILVA, K.A.; SANTOS, C.M.; MELLO, A.W., SOUSA, M.C.R. Ocorrência de Bocavirus Humano Associado as Infecções Respiratórias Agudas em Crianças de 0 a 2 aos de Idade na Cidade de Belém, Pará, Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 87-92, 2010.

SLOOTS, T.P.; MCERLEAN, P.; SPRICHER, D.J.; ARDEN, K.E.; NISSEN, M.D.; MACKAY, I.M.; Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. **Journal of Clinical Virology**, v. 35, p. 99-102, 2006.

SOUSA, T.T.;SOUZA, M.; FIACCADORI, S.F.; BORGES, T.M.A.; COSTA, S.P.; CARDOSO, P.D.D. Human bocavirus 1 and 3 infection in children with acute gastroenteritis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107 n.6, 2012.

VICENTE, D.; CILLA, G.; MONTES, M.; PEREZ-YARZA, E.G.; PEREZ-TRALLERO, E. Human bocavirus, a respiratory and enteric vírus. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p. 636-637, 2007.

WANG, Y.; GONZALES, R.; ZHOU, H.; LI, J.; LI, Y.; PARANHOS-BACCALA, G.; VERNET, G.; GUO, L.; WANG, J. Detection of human bocavirus 3 in China. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, p. 799-807, 2011.

ZHAO, H.; ZHAO, L.; SUN, Y.; QIAN, Y.; LIU, L.; JIA, L.; ZHANG, Y.; DONG, H.;
Detection of a Bocavirus Circular Genome in Fecal Specimens from Children with Acute
Diarrhea in Beijing, China. **PLoS ONE**, v. 7 (11), e48980, 2012.



**UNIVERSIDADE SALVADOR
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Salvador, 09 de agosto de 2010

Cubio Campos Soares
Carla Jaqueline Silva Sampaio

FEF: Submissão de Projeto

Projeto: "Avaliação da distribuição sazonal e caracterização molecular do Norovírus Humano em pacientes hospitalizados com gastroenterite aguda em Salvador-Bahia"

FR: 345422

Protocolo nº: 04.11.12

Prezados Pesquisadores,

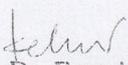
Aprezamos comunicar que o seu projeto intitulado "Avaliação da distribuição sazonal e caracterização molecular do Norovírus Humano em pacientes hospitalizados com gastroenterite aguda em Salvador-Bahia" foi APROVADO pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Salvador em Reunião Ordinária realizada em 02 de agosto de 2010.

Lilia Ferreira de Moura Costa – Orientadora

Lembramos a V.S.^a da necessidade de enviar relatórios periódicos trimestrais acerca do progresso do referido projeto para este CEP, bem como o envio do relatório final consubstanciado e documentado conforme apresentado no cronograma de seu projeto. Informamos ainda, que em se tratando de projetos de conclusão de curso, monografias, dissertações ou teses, uma cópia do manuscrito final deverá ser encaminhada para nossos registros, bem como cópias dos artigos publicados decorrentes da pesquisa realizada sob nossa aprovação.

Na certeza do cumprimento ético de suas atividades de pesquisa, desejamos a realização de um ótimo trabalho e colocamo-nos à sua disposição para esclarecer quaisquer dúvidas ou questionamentos que se façam pertinentes durante a duração do estudo aprovado.

Cordialmente,


Prof. Dr. Francisco Kelmo, PhD
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Salvador