

FREQUÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE ROTAVIRUS DO GRUPO “A” EM CRIANÇAS DE 0 - 59 MESES DE IDADE, ATENDIDAS COM DIARREIA AGUDA NA PEDIATRIA DO HOSPITAL CENTRAL DE NAMPULA, 2015

Frequency and characterization of group “A” rotavirus genotypes in children aged 0-59 months, treated for acute diarrhea in the pediatrics department of the Central Hospital of Nampula, 2015

1-Ezequias Zefanias Sitoe – ezequias5sitoe@gmail.com _ Licenciado Em Análises Clínicas e Mestre Em Epidemiologia de Campo e Laboratorial- FELTP- Doutorando em Inovação Educativa. Faculdade de Ciências de Educação e Comunicação- Universidade Católica de Moçambique (FEC-UCM). Av 25 de Setembro, Número 512, Bairro central, Cidade de Nampula- Moçambique, C.P:681,70100. E-mail: fec@ccm.ac.mz...Telefone :26 215 478

2- Nilsa de Deus – nilsa.dedeus@ins.gov.mz..Médica Veterinária pela Universidade Eduardo Mondlane-Moçambique, (DVM, MSc, PhD- Investigadora Sénior) – Mestrada e Doutorada em Medicina e Saúde Animal pela Universidade Autónoma de Barcelona: Placa Cívica,08193 Bellaterra, Barcelona, Espanha. Cell: +393347521087/ +34935811111.

Filiação:

1-Hospital Central de Nampula (HCN)-Laboratório Central de Análises Clínicas (LAC) -Sector de Microbiologia-Bacteriologia-hcnampula@gmail.com...Avenida Samora Machel, Número 1061, Telefone : 26 213001, C.P 14, Nampula.

2-Instituto Nacional de Saúde (INS), <https://ins.gov.mz...info@ins.gov.mz> - Av. de Moçambique, EN1-Estrada Nacional N° 1, Bairro da Vila-Parcela N°3943,Distrito de Marracuene - Maputo Província-Moçambique...Telefone:21 431103 Fax.21431103

RESUMO

A doença diarréica na infância constitui um importante problema de saúde pública em Moçambique. A infecção pelo Rotavírus é uma das causas mais comum de diarreia aguda grave a nível mundial, sendo a diarreia terceira causa de morbi-mortalidade infantil na maioria dos países em vias de desenvolvimento e considerado responsável por custos elevados de assistência médica e de hospitalização. Na região norte de Moçambique, há pouca informação sobre a contribuição do Rotavírus na etiologia das doenças diarréicas.

No período de Março de 2015 a Fevereiro 2016, foi realizado um estudo descritivo transversal, onde foram incluídas de forma consecutiva crianças dos 0-59 meses, com diarreia aguda internadas nos serviços de pediatria do Hospital Central de Nampula e recolhidas amostras de fezes. Foram igualmente colhidos dados demográficos e

clínicos através de um questionário padronizado. A detecção do Rotavirus foi realizada pelo teste ELISA, no laboratório de referência de virologia do Instituto Nacional de Saúde. As amostras positivas por ELISA foram genotipadas por multiplex transcriptase reversa, reacção em cadeia de polimerase (RT-PCR).

Das 296 crianças incluídas, o Rotavirus foi detectado em 26.7%, (79/296) sendo 53.2% (42/79) dos positivos do sexo masculino, 73.4% (58/79) dos casos positivos detectados foi na época fria. A distribuição de casos pelas faixas etárias e sua positividade foi a seguinte: 0-6 meses, 11.4% (9/79); 7-12 meses, 50.6% (40/79) sendo 55% masculino e 45% feminino; 13-24 meses, 32.9% (26/79); 25-36 meses, 3.8% (3/79) e 37-59 meses, 1.3% (1/79).

As 79 amostras positivas por ELISA foram genotipadas por multiplex RT-PCR. Nas amostras submetidas a RT-PCR, foram obtidas as seguintes combinações binárias mais frequentes de genótipos 77% G1P[8], G2P[6] 15% e G9P[4] 5.0%.

O estudo reporta uma frequência alta de Rotavírus em Nampula. As crianças mais afectadas foram do sexo masculino, na faixa etária de 7-12 meses de idade. O Rotavirus ocorre ao longo do ano com maior frequência no inverno, o genótipo mais frequente foi o G1P[8].

Palavras Chaves: Diarreia, Rotavirus, Nampula, Moçambique

ABSTRACT

Diarrheal disease in childhood is an important public health problem in Mozambique. Rotavirus infection is one of the most common cause of acute diarrhea worldwide. Diarrhea is the third leading cause of infant morbidity and mortality in most developing countries and responsible for high costs of medical care and hospitalization. In northern Mozambique, there is no information about Rotavirus contribution in the etiology of diarrheal diseases.

From March 2015 to February 2016, we conducted a cross-sectional study, in which were included consecutively children's for 0-59 months, hospitalized with acute diarrhea at the pediatric services of Nampula Central Hospital. In all children stool samples were collected. There were also collected demographic and clinical data through a standardized questionnaire. The detection of Rotavirus was performed by ELISA at the INS reference virology laboratory. The positive samples in the ELISA test were genotyped by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction RT-PCR.

Within 296 included children's, Rotavirus was detected in 26.7 % (79/296) from which 53.2% (42/79) of the positive cases were male children and 73.4% (58/79) of positive cases detected were detected in winter. The distribution of cases by age groups and their positivity was as follows: 0-6 months, 11.4% (9/79); 7-12 months, 50.6% (40/79) being that male 55% and female 45%; 13-24 months, 32.9% (26/79); 25-36 months, 3.8% (3/79) and 37-59 months, 1.3% (1/79). Those samples Positive in the ELISA test were genotyped by multiplex RT-PCR. From all 79 samples subjected to RT-PCR,

Rotavirus genotype G1P[8] was detected in 77 % of samples, G2P[6] in 15% and 5% in G9P[4].

This study has shown a high frequency of Rotavirus in Nampula. The most affected children's were male, aged 7-12 months old. Rotavirus was detected in the two seasons more often in the winter and the predominant circulating genotype was G1P [8].

Key words: Rotavirus, Mozambique, Nampula

1. INTRODUÇÃO

No mundo, desde a antiguidade as doenças diarreicas continuam a ser um dos principais contribuintes para a doença e morte entre crianças com menos de cinco anos principalmente nos países em desenvolvimento. Apesar do sucesso global na redução da mortalidade infantil causada por diarreia nos últimos trinta anos esta ainda continua sendo a terceira principal causa de morte em crianças menores de cinco anos. Estima-se que a diarreia seja anualmente responsável por 525000 mortes entre crianças menores de cinco anos de idade em todo mundo (Unicef, 2017).

A exemplo do número de óbitos, foi observado um declínio no número de hospitalizações por diarreia em todo o mundo. Essa redução também foi atribuída à implementação do Programa de Controle da Doença Diarreica (PCDD) da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1980. Apesar disso, esta enfermidade ainda permanece como uma importante causa de hospitalização entre a população infantil (Steele, 2012).

Entretanto crianças abaixo de três anos de idade, nos países em desenvolvimento, experimentam em média três episódios de diarreia a cada ano (Tate, 2012). Os dados da OMS – supported surveillance sites, mostram que no mundo registrou-se um declínio do número de casos de diarreia e mortes de 2010 a 2013. Este declínio de mortes é atribuído em grande parte as campanhas mundiais de tratamento da doença diarreica com a Terapia de Re-hidratação Oral (TRO) e a melhoria das condições sanitárias.

Em 2010 a diarreia foi responsável por 684891 mortes e o Rotavirus implicado em 38.7% ou seja em 264862 casos. Em 2013 a diarreia matou em todo mundo 575594 crianças menores de 5 anos e o Rotavirus foi implicado em 214806 ou 37.3% dos casos segundo dados de vigilância registrados em 90 países e 121 publicações em 74 países, o que mostra o grande impacto negativo na saúde da criança. De notar que 85% destas mortes ocorreram em países subdesenvolvidos principalmente na África subsahariana e sul da Ásia (Tate, 2016). Para realização deste estudo formulou-se como objetivo geral, determinar a ocorrência de Rotavirus em crianças dos 0-59

meses de idade com diarreia aguda, atendidas no serviço de Pediatria do HCN e caracterizar as amostras positivas e especificamente determinar a frequência de Rotavirus nas amostras fecais de crianças menores de cinco anos de idade com diarreia internadas e em ambulatório, no serviço de pediatria do HCN em 2015, descrever o perfil epidemiológico dos casos de diarreia de acordo com a positividade de Rotavirus e local de residência, Identificar os genótipos de Rotavirus circulantes em Nampula no período em estudo.

2. MOTIVAÇÃO

Em 2015, no posto sentinel da Hospital Central de Nampula (HCN), foi feito um levantamento de casos de diarreia em crianças de Pediatria, tendo-se verificado que de um total de 5691 entrados no período de Janeiro a Maio, constatou-se que a diarreia representava 26% (1484/5691) de casos de internamento por diarreia, o que justifica e satisfaz os critérios de posto sentinel de acordo com a OMS.

As deficientes condições de saneamento do meio, os hábitos culturais existentes na população de Nampula, fizeram acreditar na possível ocorrência do Rotavirus. A realização deste estudo visa descrever o peso do Rotavirus nos casos de diarreia, realçar a necessidade da introdução do teste de Rotavirus na rotina clínica e implementar acções de saúde pública.

Oferecer evidências científicas através dos resultados do estudo e a possibilidade de melhorar o sistema de vigilância de diarreias em Nampula apartir de dados gerados sobre genótipos de Rotavirus circulantes na cidade Nampula. Em virtude do grande impacto negativo de Rotavirus na saúde das crianças, abrir a possibilidade de introdução dos testes de diagnóstico de Rotavirus (ELISA e TDR) na rotina clínica do Hospital Central de Nampula.

Com a disponibilidade da vacina de Rotavirus, informações fiáveis sobre a carga de doença por Rotavirus nos diferentes países Africanos como Moçambique são necessárias para permitir a tomada de decisões baseada em evidências. A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem vindo a apoiar desde 2006, os estados membros para estabelecerem vigilância sentinel para a diarreia por Rotavirus em crianças menores de cinco anos de idade usando directrizes padronizados. Realizou – se este estudo para responder a seguinte questão: Qual é a frequência do Rotavirus em crianças menores de cinco anos de idade com diarreia aguda, nos Serviços de Pediatria do Hospital Central de Nampula (HCN)?

3.PROBLEMA

Em países de baixa renda a doença diarreica continua a ser uma das principais causas de mortalidade e morbidade (Unicef, 2017). Em Moçambique, a diarreia é a

terceira causa de morte em crianças menores de 5 anos de idade. Dados do centro de investigação da Manhiça do Estudo Multicêntrico Global Entérico (GEMS) indicam que 51/681 (7.5%) crianças morrem anualmente devido a esta infecção (Kotloff, 2013).

Entretanto, existe pouca informação sobre a contribuição de Rotavírus como causa de diarreia em Moçambique. Dos poucos estudos realizados no país, a maioria foram na região sul e os dados obtidos não são representativos da população nacional com o agravante de que nenhum estudo foi realizado na região norte do país (Mandomando, 2007; Nhampossa, 2015; Kotloff, 2013; Langa, 2016; de Deus, 2017). Este estudo visa fornecer dados epidemiológicos e dos genótipos em circulação. Torna-se muito urgente que este estudo forneça resultados que apoiem o programa nacional de imunização na identificação dos genótipos circulantes e para posterior monitoração da dinâmica de estirpes de genotipos, o que justifica a importância de ter dados científicos.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que antes da implementação de medidas de prevenção e controle contra este agente, seja estabelecido um sistema de vigilância epidemiológico baseado em postos sentinelas, que permita a recolha sistemática de informação de forma permanente sobre o comportamento da doença e os genótipos predominantes, assim como a detecção de mudanças na tendência da infecção. Actualmente estão disponíveis vários tipos de vacinas para o Rotavirus a nível internacional. Em Moçambique a vacina contra Rotavirus foi introduzida em 4 de Setembro de 2015.

4.RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Melhorar ou prover o conhecimento sobre a infecção pelo Rotavirus na província de Nampula, reportar ao Ministério da Saúde os primeiros dados sobre Rotavirus na região norte do país contribuindo para a melhoria da saúde da comunidade e cuidados das crianças com diarreia.

Contribuir para a melhoria da saúde pública em particular a saúde da criança, proporcionar informação para os decisores de saúde pública, gerar evidências melhorando o diagnóstico e assistência médica, usar os dados recolhidos e analisados, para orientar as decisões e monitorizar o funcionamento das estratégias de controle do Rotavirus nos programas nacionais de imunização.

5.REFERENCIAL TEÓRICO SOBRE ROTAVÍRUS

5.1 Classificação Taxonómica

Os Rotavirus pertencem ao género Rotavirus, um dos quinze membros da família Reoviridae. Esta família, cujo nome deriva da palavra ou expressão em inglês

“Respiratory Enteric Orphan, foi criada em 1959 para incluir vírus identificados nas mucosas respiratórias e intestinal, sem estarem associados a doença conhecida e por isso designados “orphan vírus”. Esta ideia está ultrapassada actualmente mas a designação permaneceu. O género Rotavirus apresenta como características comuns partículas virais icosaédricas, com várias camadas protéicas, sem invólucro e um genoma de dupla cadeia de ácido ribonucléico (dsRNA) composto por 10-12 segmentos maioritariamente monocistrónicos (Regenmortel, 2000).

De acordo com o Comité Internacional na Taxonomia dos Vírus (ICTV), o Rotavirus é classificado em 8 grupos distintos (de **A** a **H**), assim como de 4 subgrupos específicos dentro do grupo "**A**". Rotavirus dos grupos "**A**" a "**C**", podem ser encontrados em seres humanos e em animais, enquanto os Rotavirus dos grupos "**D-H**", são limitados exclusivamente aos animais.

O Rotavirus do grupo "**A**" é o mais importante para a infecção e a doença em humanos. De todas as espécies o Rotavírus "**A**" existe em todo mundo e é responsável de mais de 90% de infecções em seres humanos. Infecções por Rotavírus "**A**" ocorrem ao longo da vida, a primeira geralmente produz sintomas, mas as infecções subsequentes são tipicamente leves ou assintomáticas. Rotavirus "**B**", também tem causado grandes epidemias de diarreia grave que afecta milhares de pessoas de todas as idades na China e Índia é endémica. Rotavirus "**C**", tem sido associado a casos raros e esporádicos de diarreia em crianças com pequenos surtos que ocorrem em famílias (Estes, 1989).

Em 1943, Jacob Luz e Horace Hodes provaram que um agente patogénico filtrável nas fezes de crianças com diarreia infecciosa, também causou diarreia em bovinos. Três décadas mais tarde, amostras conservadas identificaram o agente etiológico Rotavirus. Em 1973, Ruth Bishop descreveu vírus relacionados encontrados em crianças com gastroenterite (Bishop, 1973).

Em 1974, Thomas Henry Flewett sugeriu o nome de Rotavirus depois de observar que, quando visto através de um microscópio electrónico, uma partícula de Rotavirus parece uma roda (rota, em latim), quatro anos depois o nome foi oficialmente reconhecido pelo Comité Internacional de Taxonomia de Vírus. Em 1976, os vírus relacionados foram descritos em diversas outras espécies de animais. Esses vírus, todos causando gastroenterite aguda, foram reconhecidos como um patógeno colectivo que afecta seres humanos e animais em todo o mundo.

Genótipos de Rotavirus foram primeiramente descritos em 1980 e no ano seguinte, o Rotavirus proveniente de amostras fecais de seres humanos, foi isolado em culturas de células derivadas de rins de macaco pela adição de tripsina (uma enzima encontrada no duodeno de mamíferos e agora conhecida por ser essencial para Rotavirus replicar) ao meio de cultura. A capacidade de cultivar Rotavirus em meio de cultura foi responsável por acelerar o ritmo das investigações e em meados da década de 1980 os primeiros candidatos a vacinas estavam a ser avaliados (Ward, 2008).

5.2 Morfologia e Estrutura do Virião

As partículas virais maduras dos Rotavirus são esféricas (~100 nanómetros (nm) de diâmetro), sem invólucro, com simetria icosaédrica ($T=13$) e constituídas por três camadas protéicas concêntricas “triple layer particle” (TLP) (Figura 2) (Prasad, 1988). A camada interna é composta por 120 cópias da proteína estrutural VP2 (~102 quilodaltons (kDa) que envolve o genoma viral e complexos enzimáticos, constituindo as partículas de camada única “single layer particle” (SLP), ~37-40 nm de diâmetro (Prasad, 1988).

Os complexos enzimáticos, constituídos pela RNA-polimerase viral (VP1, ~125 kDa) e pela enzima de capping guanilil-transferase (proteína estrutural VP3, ~88 kDa), estão associados a cada um dos segmentos genómicos e localizam-se na proximidade dos vértices da cápside (David, 2013).

A camada intermédia é constituída por 260 trímeros da proteína estrutural VP6 (~45 kDa) que serve de âncora às proteínas da camada externa (Estes, 2006). As partículas virais com estas duas camadas “double layer particle” (DLP), ~55 nm de diâmetro (Prasad, 1988), são transcricionalmente activas e não infecciosas, contrariamente às TLPs.

A camada externa, estabilizada por iões cálcio, consiste em 260 trímeros da glicoproteína VP7 (~34 kDa) de onde se projetam cerca de 60 espículas de trímeros da proteína VP4 (~84 kDa) sensível a proteases. Estas espículas possuem dois domínios externos globulares, um corpo central e um domínio interno globular inserido na camada de VP7. A tripsina intestinal corta proteoliticamente VP4 em duas proteínas, VP8 (28 kDa, N-terminal) e VP5 (60 kDa, C-terminal), que se mantêm associadas no vírus. VP8 liga-se aos receptores celulares, enquanto VP5 apresenta uma região hidrofóbica com propriedades fusogénicas e está envolvida na penetração das membranas celulares (Ruiz, 2009).

Nos 12 eixos de simetria icosaédrica existem canais que atravessam as três camadas proteicas, estes canais permitem a importação de metabolitos necessários para a transcrição do genoma viral e a exportação dos transcritos de ácido ribonucleico (RNA) viral (Greenberg, 2009).

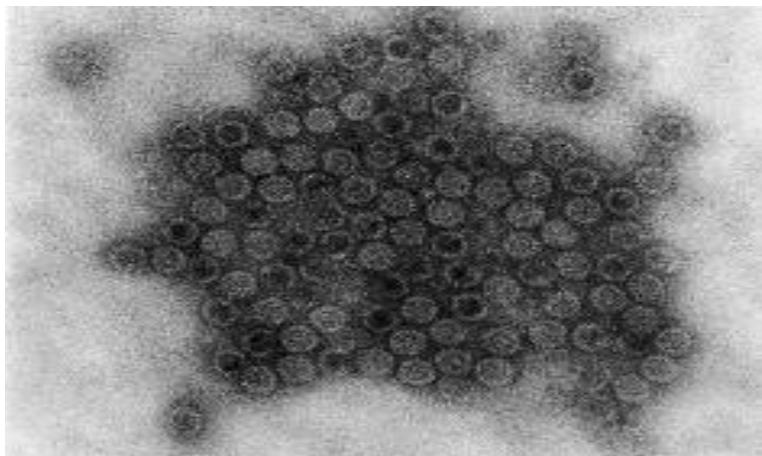


Figura 1. Micrografia eletrônica das partículas de rotavírus, Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas.

5.3 Organização do Genoma

O genoma dos RVA consiste de 11 segmentos de Ácido Ribonucleico (ARN) de dupla fita (ARNdf) que variam em tamanho de 667 a 3302 pares de bases (pb), codificando 6 proteínas estruturais (VP1-4, VP6-7) e 5 ou 6 proteínas não estruturais (NSP1-6) (Figura 2) Estes, 1989).

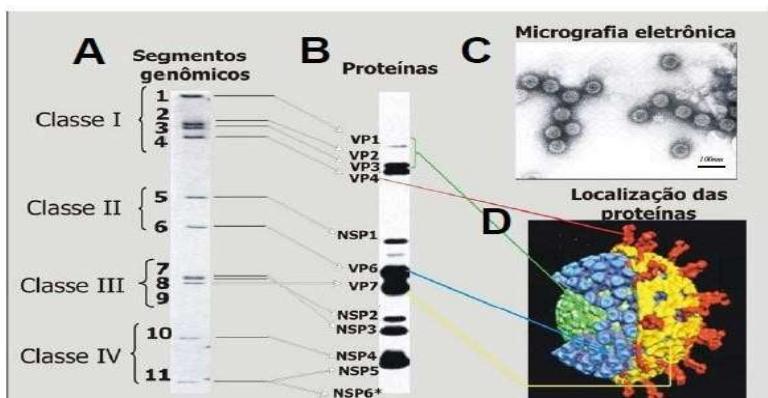


Figura 2. Esquema estrutural do genoma e partículas virais dos Rotavirus.

Legenda da Figura 2. A: Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) dos 11 segmentos do genoma do Rotavirus “A” símio (SA-11). B: Gel de poliacrilamida mostrando a separação das proteínas estruturais (NSP1 – NSP6) e não estruturais (VP1 – VP4, VP6 – VP7) sintetizadas pelo Rotavirus A SA-11. C: Micrografia electrónica de Rotavirus “A”. D: Reconstrução em 3D do vírion de SA-11, mostrando a localização das proteínas estruturais (Ramig,2004).

A Figura 3 mostra a fase de leitura aberta (ORF, do inglês Open Reading Frame) que está flanqueada pelas regiões não codificantes 3' e 5' que podem variar em comprimento, mas que apresentam em comum pequenas sequências nucleotíidas, que são importantes sinais para a transcrição, transporte de ARN, replicação, montagem ou empacotamento dos segmentos genómicos (Halstead, 2018). Todos os 11 segmentos devem apresentar os mesmos sinais de activação em cis já que são todos replicados pela mesma polimerase. Além disso, cada segmento deve conter um sinal único porque estes devem ser distinguidos um dos outros durante o empacotamento (Greenberg, 2009).

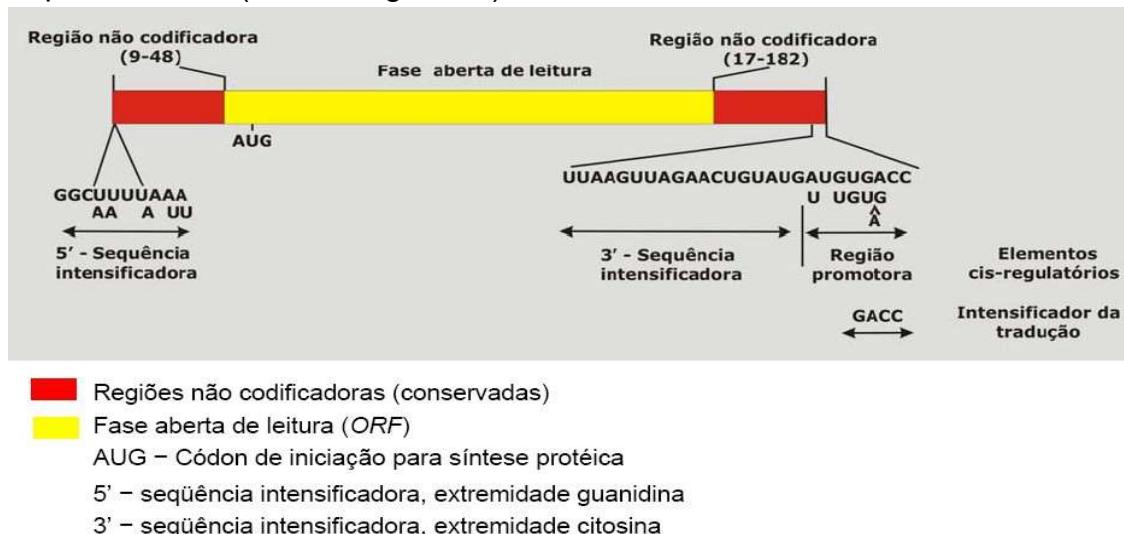


Figura 3. Esquema da organização geral dos segmentos génicos de Rotavírus da espécie "A". Abreviações: A, Adenina; C, Citosina; G, Guanina; ORF, do inglês Open Reading Frame; pb, pares de bases; U, Uracilo.

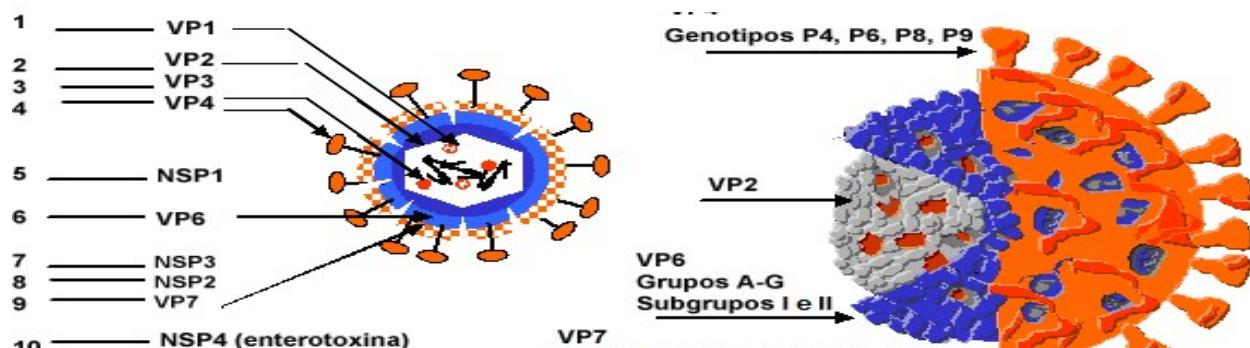


Figura 4. Representação esquemática da estrutura do rotavírus. Adaptada de Cunliffe et al, Lancet 2002 359 640-642. Representando o genoma, as proteínas estruturais e não estruturais, onde cada segmento codifica para uma proteína específica.

Tabela 1. Proteínas estruturais e não estruturais dos rotavírus e respetivas funções.

Segmento	Proteína	Massa Molecular (kDa)	Localização no Virião (nº)	Propriedades Funcionais
----------	----------	-----------------------	----------------------------	-------------------------

Genérico			de cópias)	
1	VP1	125	Nucleóide/core (12)	- RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp); - Ligação específica ao RNA viral;
2	VP2	102	Camada Interna (120)	- Ligação ao RNA; - Essencial para a replicação viral.
3	VP3	88	Nucleóide/core (12)	- Forma um complexo de transcrição com VP1; - Guaniltransferase e Metiltransferase.
4	VP4 (VP5*+VP8*)	87 (60+28)	Espículas da camada externa (180)	- Ligação aos receptores celulares; - Penetração das membranas celulares - Indução de anticorpos neutralizantes; - O corte proteolítico aumenta a infeciosidade do vírião;
5	NSP1	59	Não Estrutural	- Antagonista da resposta antiviral inata (IFN). - Não é essencial para a replicação do vírus em culturas celulares
6	VP6	45	Camada Intermédia	- Confere estabilidade ao vírião; - Sequências conservadas permitem a classificação em Grupos e Subgrupos.
7	NSP3	36	Não Estrutural	- Ligação específica ao ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) viral facilitando a sua tradução e inibindo a acção de nucleases. Inibição da tradução das proteínas celulares.
8	NSP2	35	Não Estrutural	- <i>RNA nucleoside triphosphatases</i> (NTPase) e helicase; - Envolvida na formação dos viroplasmas. - Antagonista da resposta antiviral inata.
9	VP7	34	Camada Externa (780)	- Glicoproteína; - Indução de anticorpos neutralizantes; - Classificação em serótipo e genótipo G.
10	NSP4	20	Não Estrutural	- Glicoproteína; Morfogénese; - Enterotoxina; Viroporina; - Mobilização de Ca ²⁺ (cálcio), secreção de Cl ⁻ (cloreto) e redução da absorção de glicose pelas células intestinais.
11	NSP5	28-32	Não Estrutural	- Fosfoproteína O-glicosilada; - Autocinase; - Associa-se a NSP2 na formação dos viroplasmas; - Essencial na replicação viral.
	NSP6	12	Não Estrutural	- Função mal conhecida

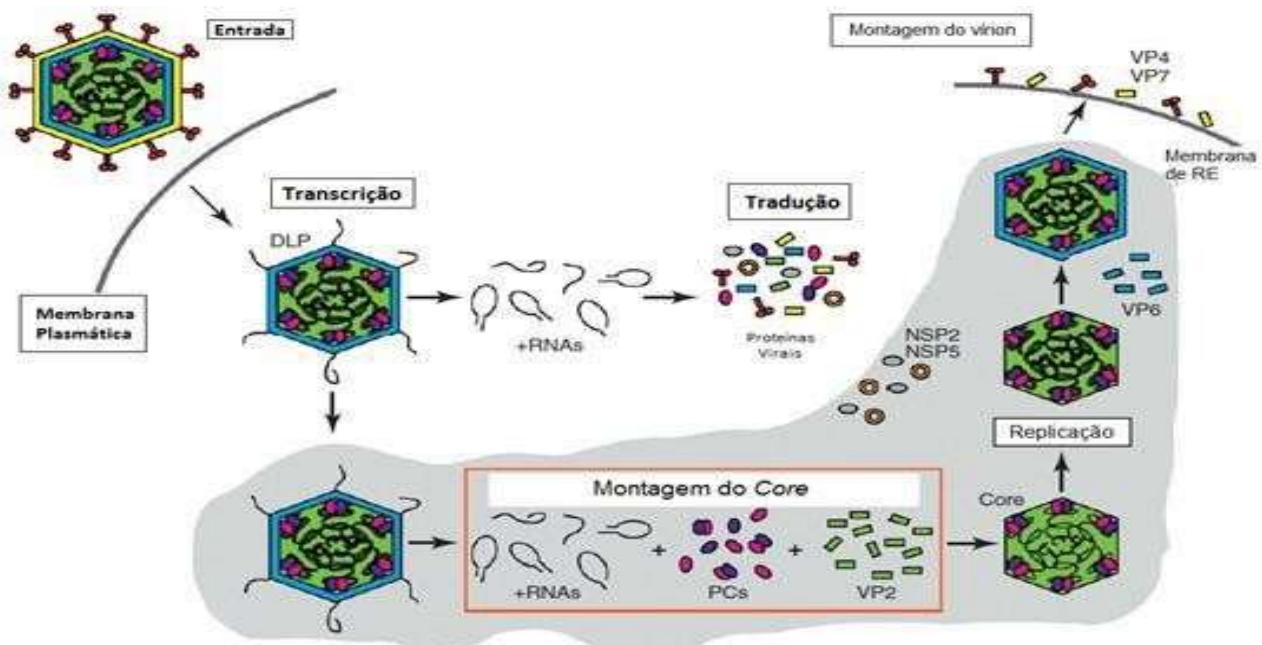


Figura 5. Esquema da biossíntese dos rotavírus da espécie A. Figura adaptada de McDonald & Patton, 2011.

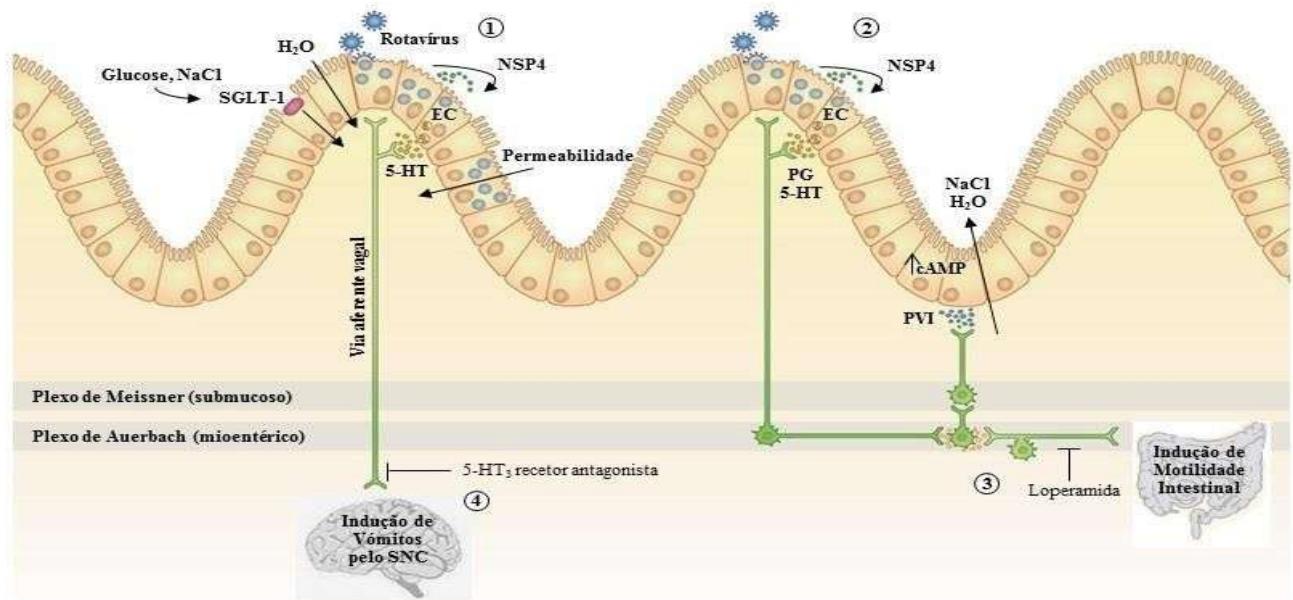


Figura 6. Mecanismos causadores de diarreia e vômito por Rotavirus.

Legenda da figura 6. (1) Lesões irregulares, atrofia da vilosidade intestinal. A actividade das dissacaridases fica moderadamente diminuída nas células infectadas com Rotavirus. (2) Produção da enterotoxina NSP4 extracelular estimula a libertação da serotonina (5-HT) pelas células de enterocromafina e activação dos nervos aferentes. Os enterócitos e as células de enterocromafina infectadas com Rotavirus determinam produção de prostaglandinas (PG). (3) O plexo nervoso submucoso está associado a secreção de água e electrólitos enquanto o plexo mioentéricico estimula principalmente a motilidade intestinal. (4) A infecção por Rotavirus estimula os

afferentes vagais para o centro do vômito no sistema nervoso central (SNC). Adaptado de (Hagbom, 2012).

5.4 Epidemiologia

Globalmente, estima-se que o número de mortes por Rotavirus em crianças menores de 4 anos de idade diminuiu de 528 000 no ano 2000 para 215 000 em 2013. Em 2013, estimou-se que ocorreram na Índia, 47 100 mortes por Rotavirus, 22% de todas as mortes por Rotavirus ocorridas globalmente. Quatro países (Índia, Nigéria, Paquistão e República Democrática do Congo) representam aproximadamente metade (49%) de todas as mortes por Rotavirus estimadas em 2013, (Tate, 2016).

Já foram descritos 14 sorotipos **G** e a designação de tais sorotipos é idêntica à denominação de genótipos **G**, do total de 14 genotipos **G** descritos, dez já foram isolados em humanos e são G1 a G6, G8 a G10 e o G12. Recentemente foi descrito um novo sorotípo **G**, isolado na Índia apartir de bovinos, esse isolado ainda não foi testado por ensaio de neutralização para definição do sorotípo (Castello, 2006).

Os sorotipos e os genótipos denominados como **P** não são coincidentes para diferenciar sorotipos de genótipos, os primeiros são descritos pela letra **P** seguido de um número e os últimos pela letra **P** seguida de número entre parêntesis. Até o momento, foram descritos 14 sorotipos **P**, nove foram isolados de humanos e 26 genotipos **P**, dez infectando humanos. Como os genes que codificam as proteínas VP4 e VP7 podem se segregar de maneira independente, várias combinações entre **G** e **P** podem ser detectadas na natureza (Santos & Hoshino, 2005); (Castello, 2006). Considerando a distribuição mundial dos genótipos, segundo Santos e Hoshino (2005), os mais frequentes são o G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8], que respondem por 88,5% das diarreias causadas por Rotavirus em todo o mundo. A figura 7, resume a distribuição dos genótipos de Rotavirus do grupo "A" humanos definida a partir da revisão de 124 estudos publicados entre 1989 e 2004 realizados em 52 países dos 5 continentes.

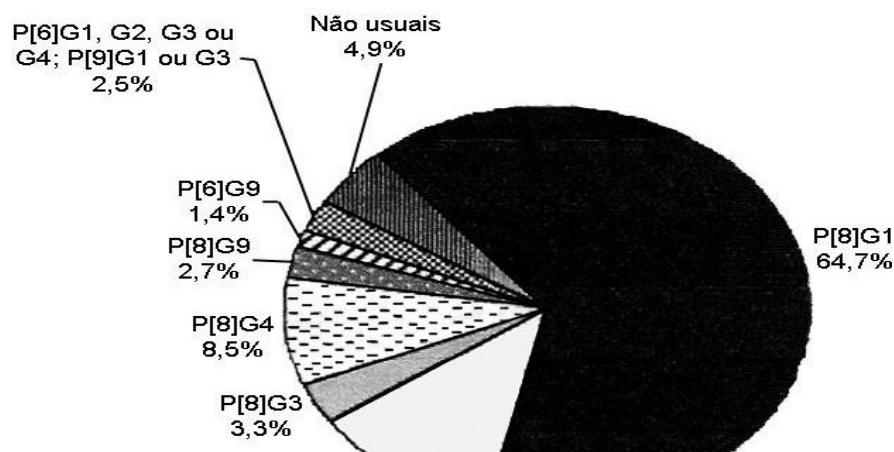


Figura 7. Distribuição mundial dos genótipos G e P de Rotavirus humanos do grupo A entre crianças a partir de trabalhos publicados entre 1989 e 2004. (Santos, 2005).

6. METODOLOGIA

6.1 Tipo de estudo:

Foi desenvolvido um estudo descritivo transversal.

6.2 Local do estudo

O Estudo decorreu no Hospital Central de Nampula (HCN), as amostras foram colhidas na enfermaria de pediatria, no internamento e serviço de urgências de Pediatria. O posto sentinel da Hospital Central de Nampula, foi seleccionado com base em critérios definidos pela Organização Mundial as Saúde (OMS), que são atender pelo menos 100 crianças menores de cinco anos de idade hospitalizadas por gastroenterite aguda por ano e ter condições e capacidades laboratoriais necessárias para armazenamento e processamento de amostras. Este hospital é de 4º nível e de referência para a região Norte de Moçambique, é posto sentinel do Ministério da Saúde (MISAU) para o registo de dados e notificação de casos de várias doenças infecciosas, este estudo foi realizado dentro de um macroprojeto do Instituto Nacional de Saúde (INS) intitulado Vigilância Nacional de Diarreias Agudas em Crianças (ViNaDiA), que tem como objectivo determinar a carga de diarreias agudas em crianças e os agentes etiológicos associados.

O HCN localiza-se na província de Nampula onde reside cerca de 20% da população Moçambicana e ciclicamente regista casos de diarreia com números consideráveis de acordo com os dados do MISAU, Departamento de Saúde Pública. O Hospital tem capacidade de 529 camas e 196 camas para pediatria, facto que justifica a sua escolha e prioridade. A província de Nampula tem 23 distritos e de acordo com recenseamento geral da população de 2007 a população residente é de 3.985.613 habitantes numa Área de 79 010 Km2 e com uma densidade de 50,44 habitantes por Km2 (INE, 2014).

6.3 Período do Estudo

O Estudo decorreu entre Fevereiro de 2015 a Março de 2016.

6.4 População do Estudo

Este estudo realizado em Nampula, faz parte de um macroprojeto denominado Vigilância Nacional de Diarreias Agudas (ViNaDiA) conforme a aprovação ética do Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS), com Refª.348/CNBS/13, datado de 26 de Novembro de 2013, com despacho Ministerial de Autorização para o Posto Sentinel do Hospital Central de Nampula, com Nota 41.053/2014, datado de 14 de Janeiro de 2014. O estudo teve como população alvo crianças de ambos os sexos menores de cinco anos de idade, com gastroenterite aguda (com diarreia, definida por três ou mais defecções líquidas ou pastosas num período de 24 horas, e/ou vômitos). Estas crianças (a cumprir os critérios de inclusão definidos) foram atendidas nos serviços de urgência do Hospital Central de Nampula (HCN).

A Vigilância foi implementada no HCN em Março de 2015. Para o presente estudo, foram incluídos dados de Março de 2015 a Fevereiro de 2016, ou seja durante um ano para incluir a época seca e a chuvosa. A época seca também denominada “inverno”, em Moçambique estende-se de Abril a Setembro e o “verão” ou época chuvosa, de Outubro a Março de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia

(INAM, 2014). Importa referir que devido a perda excessiva de casos nos serviços de Urgência de Pediatria (Triagem e Internamento de Curta Duração-ICD) todos casos incluídos são da enfermaria de diarreia concretamente a pediatria 1.

Zona Urbana = é o espaço ocupado por uma cidade, caracterizada pela edificação contínua e pela existência de infra-estruturas que compreendem o conjunto de serviços públicos, comércio, religioso e turístico de um município e que possibilitam a vida da população.

Zona Suburbana = é a região periférica da cidade sem poder de agregar alto valor comercial, turístico, administrativo e infraestrutural.

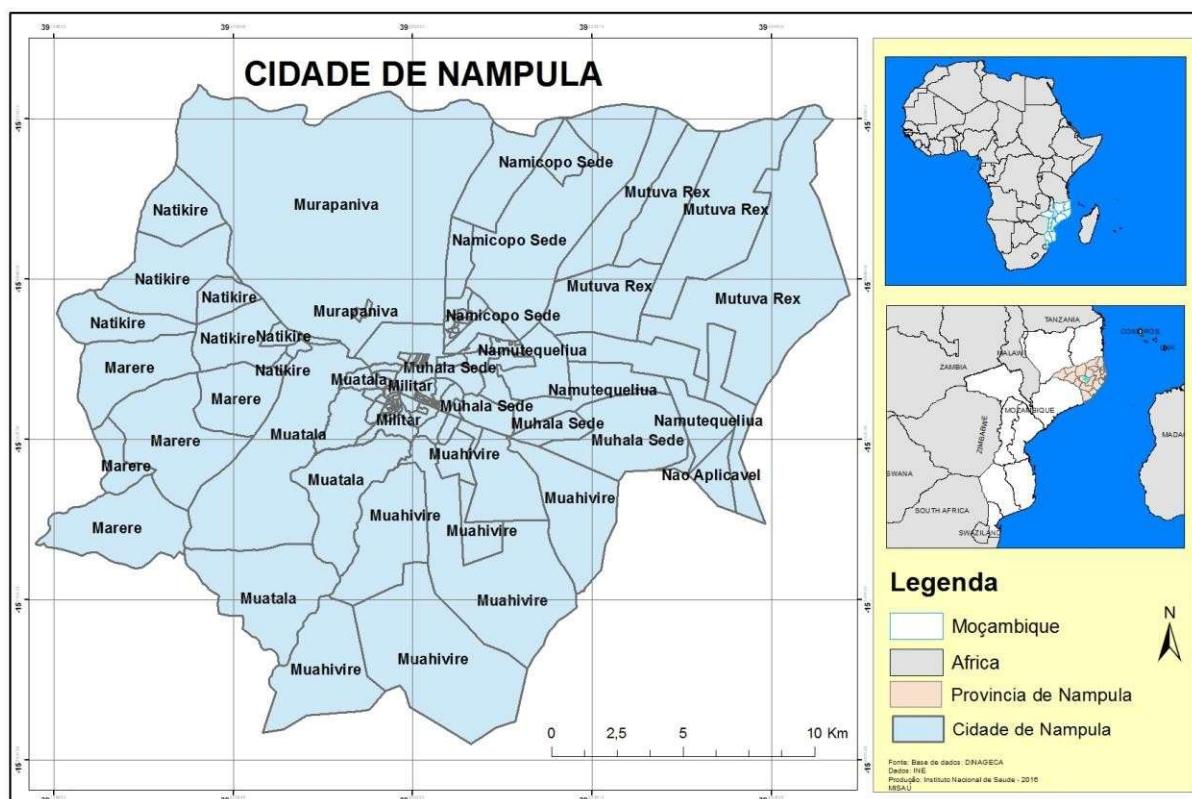


Figura 8. Mapa da província e Cidade de Nampula com localização da cidade do mesmo nome. Fonte: Wikipédia a enciclopédia livre 12/05/2016

6.5 Critério de Selecção dos Participantes, Amostra, Amostragem

A amostragem foi não probabilística por conveniência. Durante o período do estudo, os acompanhantes das crianças admitidas no serviço de Pediatria do HCN e diagnosticadas (GEA) pelo médico, depois de verificados todos os critérios de inclusão previamente estabelecidos, foram abordados para autorização de participação no estudo e depois de reunidas todas as condições, ambiente de tranquilidade e estabilidade para o paciente e acompanhantes foi pedido para se

colher uma amostra de fezes. A enfermeira responsável pela colheita de amostras deu a informação sobre o estudo, importância e as vantagens da participação aos acompanhantes, benefício dos resultados dos testes que serão feitos e também de um melhor tratamento. O diagnóstico dos microorganismos 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 diarréicas e as mortes causadas por diarreia. Seguidamente, foi pedido aos pais/cuidadores ou representantes das crianças a assinatura do consentimento informado no qual se detalha todo o procedimento desde a colheita das amostras e toda cadeia de processamento até a obtenção do resultado final.

A enfermeira procedeu todos os registos específicos conforme os instrumentos do estudo obtendo como fonte de dados para além do registo no livro de Pediatria de onde todo elemento da população que dá entrada fica assinalado com data, hora e proveniência.

6.6 Colheita e Armazenamento de Amostras

A colheita de amostras de fezes foi realizada pela enfermeira, para um recipiente estéril devidamente identificado de acordo com procedimentos pré-definidos. As amostras foram mantidas de forma refrigerada (2°C - 8°C) até serem embaladas em colmans com bolsas de gelo e transportadas pela empresa transportadora até Maputo onde foram armazenadas a -80°C.

6.7 Recolha de dados Demográficos

Os dados foram colhidos usando uma ficha de recolha de dados do ViNaDia que inclui Informações sobre a criança e as condições sanitárias (idade da criança, tipo de alimento, fonte de água), dados epidemiológicos e clínicos da criança e relacionados com a doença diarréica (Tempo de duração, número de dejecções, consistência das fezes).

6.8 Detecção de Antigénios Virais

A detecção de antigénios de Rotavirus em amostras de fezes foi realizada através do teste ELISA Kit de Elisa Prospect TM Rotavirus Oxoid Microplate Assay Oxoid Ltd wade Road Basingstoke Hants, RG248pw, UK, IFU X7596C, Revised April 2012. (Prospect TM Rotavirus Oxoid, Inglaterra) para detecção de RVA, segundo as recomendações do respectivo fabricante. O ELISA de detecção do Antígeno Ag de Rotavirus é um dispositivo com 96 poços para detecção directa de Rotavirus em amostras de fezes (Teste padrão ouro reconhecido pela OMS) ao passo que o Teste rápido de diagnóstico (TDR) é um cartucho para determinação do antigénio viral do grupo Rotavirus, baseado na aglutinação directa das partículas de látex em lâmina.

6.9 Genotipagem de Rotavirus

A identificação dos genótipos de Rotavirus decorreu de acordo com o algoritmo esquematizado na (Figura 10). Resumidamente, no caso das amostras positivas para Rotavirus por ELISA procedeu-se à extracção de RNA, síntese de Ácido Desoxirribonucleico complementar (cDNA) a partir do RNA extraído (transcrição reversa), amplificação por Polymerase Chain Reaction (PCR) de sequências dos genes para VP4 e VP7 (genótipos G e P, respectivamente) usando primers genéricos numa primeira reacção, seguido de primers específicos de genótipo numa segunda reacção (semi-nested PCR) e análise dos produtos de amplificação.

6.10 Gestão de Dados

Os dados foram introduzidos por dois digitadores de forma independente e posteriormente cruzados e a base limpa. Os dados estão sob gestão do Departamento de Vigilância do INS e o acesso é restrito apenas aos investigadores, têm o tratamento confidencial, os pacientes são tratados pelo número do código e nunca pelo nome.

6.11 Análise Estatística

Os dados epidemiológicos foram analisados com recurso ao pacote estatístico SPSS, versão 21.0. A análise e comparação das variáveis foi efectuada com recurso aos testes Qui-quadrado, T- test e o teste exacto de Fisher tendo sido considerado o limite de significância estatística de 5% ($p < 0.05$). O estado nutricional foi analisado pela equipa médica de pediatria usando os indicadores de malnutrição calculados com o auxílio do programa WHO Anthro, disponibilizado no site da OMS. Com base nas características antropométricas como o peso e a altura para a idade das crianças inquiridas, foi usada a regressão logística para análise dos factores de risco.

6.12 Limitações do Estudo

O tempo de duração deste estudo foi o principal factor limitante e por ser de base hospitalar e o tamanho amostral não permite inferir resultados estatísticos obtidos neste trabalho e a perda de casos de diarreia no ambulatório.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Resultados

7.1.1 Caracterização Demográfica e Clínica da População Estudada

No total em 2015, o Departamento de Pediatria do (HCN) atendeu 94421 crianças em todos sectores (Pediatria 1 a 3), tendo registado 3.5% (3320/94421) com diarreia, o que corresponde a 277 casos de diarreia por mês, 70 casos semanais e 10 diários. Este estudo capturou e incluiu 8.9% (296/3320) casos de diarreia.

Foram incluídas 296 crianças no estudo, das quais 170/296 (57,4%) eram do sexo

Masculino e 126/296 (42,6%) do sexo Feminino. Sendo que destas 278/296 (93,9%) residia na zona urbana e 10/296 (3,4 %) da área suburbana, para além de (8/296) 2,7% serem provenientes dos distritos circunvizinhos, com intervalo de inclusão variando entre 1 mês e 59 meses, sendo que a maior frequência de gastroenterite causada por Rotavirus foi observada em crianças na faixa etária dos 7-12 meses 50,6% (40/79).

A população estudada provinha de 14 bairros da cidade de Nampula sendo 11 urbanos e 3 suburbanos incluindo distritos circunvizinhos. Das 296 amostras analisadas, 79 foram positivas à testagem para o Rotavirus por teste ELISA sendo que a taxa de detecção foi de 26.7%. O número de casos positivos de Rotavirus observado foi maior entre os rapazes 53.2% (42/79) e 46,8% (37/79) para raparigas mas não tendo registo estatisticamente significativo ($p= 0,245$), sendo que os bairros com mais casos foram Muahivire 16,9%, Muatala 12,2%, Namutequelua 8,8% e Mutauanha 8,4%.

A infecção por Rotavirus foi detectada em todas as faixas etárias conforme a estratificação (0-6) meses 11,4% (9/79), (7-12 meses) 50,6% (40/79) com maior incidencia para rapazes com 55% (22/40) e raparigas 45% (18/40), (13-24 meses) 32,9% (26/79), (25-36 meses) 3,8% (3/79) e (37-59 meses) 1,3% (1/79). Assim, verificou-se ser mais comum em crianças com idade ≤ 24 meses com 94.9% (75/79) com significado estatístico ($p = 0.007$). O local de residência classificado em área urbana e suburbana não teve significância estatística ($p= 0,068$) (ver Tabela 2). Em relação à alimentação, a frequência de Rotavirus foi de 57% (45/79) em crianças alimentadas por outros alimentos diversificados e 43% (34/79) em crianças exclusivamente amamentadas pelo leite natural.

Rotavirus causa gastroenterite aguda (GEA) que cursa com diarreia, febre e vômitos. Clinicamente os vômitos apresentam significado estatístico ($p =0.003$); 72.2 % (57/79) das crianças infectadas pelo Rotavirus tinha vômitos, 27.8% (22/79) das crianças infectadas por Rotavírus tinha diarreia mas sem vômitos, enquanto que a febre não teve significado estatístico ($p=0.541$) com 29.1% (23/79) de crianças infectadas por Rotavirus com febre e 70,9% (56/79) crianças com uma temperatura axial $\leq 37.5^{\circ}\text{C}$ (sem febre). A desnutrição não foi estatisticamente significativa ($p = 0.503$), das crianças infectadas com Rotavirus 15.2% (12/79) apresentaram sinais de desnutrição e 84.8% (67/79) crianças Rotavirus positivo sem desnutrição. Em relação à alimentação, verificou-se que 69.3% (205/296) das crianças eram alimentadas por outros alimentos diversificados, sendo que a percentagem de crianças exclusivamente amamentadas foi de 30.7 % (91/296). Uma percentagem significativa das crianças 67.9% (201/296) manifestou diarreia e vômitos, no entanto só 33.1% (91/296) das mesmas apresentou síndrome febril, ou seja, uma temperatura axial igual ou superior a 37.5°C (ver Tabela 3).

Relativamente ao estado de nutricional das 296 crianças avaliadas, observou-se que 82.1% (243/296) não apresentava qualquer característica de desnutrição, enquanto 17.9 % (53/296) foram identificados com sinais de desnutrição (ver Tabela 5). Em

relação a distribuição dos casos de Rotavirus ao longo do período em análise a figura 13 mostra a ocorrência de Rotavirus ao longo de todo ano, com maior proporção de casos na época fria concretamente nos meses de Maio a Julho. No inverno (Abril a Setembro) registaram-se mais casos [73.4% (58/79)] do que na época quente ou verão (Março a Outubro) [26.6% (21/79)].

Tabela 2. Distribuição das características demográficas da população alvo e a relação com a infecção por Rotavirus

Variáveis	Categorias	Nº de Crianças (N=296)	Rotavirus + (n=79)	Rotavirus – (n=217)	Valor-p
Variáveis	Categorias	n (%)	n (%)	n (%)	Valor-p
Género	Masculino	170 (57.4)	42(53.2)	128 (59.0)	0.245 ^{a)}
Género	Feminino	126 (42.6)	37(46.8)	89(41.0)	0.245 ^{a)}
Idade (meses)	0-6	20 (6.8)	9(11.4)	11 (88.6)	0.007 ^{a)}
Idade (meses)	7-12	131 (44.3)	40(50.6)	91 (49.4)	0.007 ^{a)}
Idade (meses)	13-24	91 (30.7)	26(32.9)	65 (67.1)	0.007 ^{a)}
Idade (meses)	25-36	26 (8.8)	3(3.8)	23 (96.2)	0.007 ^{a)}
Idade (meses)	37-59	28(9.5)	1(1.3)	27 (98.7)	0.007 ^{a)}
Local de residência	Urbana	286 (95.8)	79 (26.7)	207 (73.3)	0.068 ^{b)}
	Suburbana	10 (4.2)	0 (0.0)	10 (100%)	0.068 ^{b)}

a) Foi utilizado o teste exacto de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

b) Foi utilizado o teste estatístico Qui-quadrado para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

A Tabela 3 apresenta a distribuição das características clínicas em relação à infecção por Rotavirus, pode-se observar que nas crianças estudadas, a duração média da diarreia e vômitos foi de 2 dias, e a da febre foi de 3 dias, que 98/296 (33%) das crianças apresentaram febre das quais 23 positivas para Rotavirus, enquanto que 201/296 (68%) tinha vômitos e destas, 57 foram positivas para Rotavirus, a desnutrição foi registada em apenas 18% (53/296) das crianças com 12 positivas para Rotavirus e por fim o aleitamento exclusivo foi registado em 30% (91/296) das crianças com 34 positivas para Rotavirus.

A mesma Tabela 3, mostra ainda as condições de higiene e saneamento do meio em relação ao Rotavirus, foi usada a regressão logística para estimar a probabilidade associada à ocorrência de Rotavirus. Sendo que em face das variáveis comportamentais ou atitude de tratamento de água e lavagem das mãos não foi estatisticamente significativo [0.544-9.657 (I.C 95%)] e [0.587-0.856 (IC 95%)] respectivamente ou seja não foi evidenciada atitude associada a ocorrência do fenómeno apesar de indicar razão de chance (OR) aumentada 1.8 vezes para não

lavagem das mãos e 2.2 vezes para o não tratamento de água. As variáveis de posse de casa de banho e fonte de água foram estatisticamente significativos ou seja evidenciam a associação das variáveis com a ocorrência de Rotavirus sendo que [1.578-5.262 (IC 95%)] e [1.025-4.429 (IC 95%)] respectivamente com razão de chance (OR) aumentada 2.1 vezes para o não uso de fonte de água melhorada e 2.8 vezes para o não uso de casa de banho melhorada.

Tabela 3. Características clínicas da população com gastroenterite aguda e relação com a infecção por Rotavirus.

Características Clínicas	Nº Crianças N=296	Rotavirus + n=79	Rotavirus – 217	Valor_p ^{a)}
	n(%)	n (%)	n (%)	
Febre (T^a ≥37.5°C)	Sim = 98 (33.1)	23 (29.1)	75 (34.6)	a)0,541
Temperatura axial	Não = 198 (66.9)	56 (70.9)	142 (65.4)	
Vómitos (n= 296)	Sim = 201 (67.9)	57 (72.2)	144 (66.4)	a)0,003
	Não= 95 (32.1)	22 (27.8)	73(33.6)	
Alimentação (n=296)	Outros 205 (69.3)	45 (57.0)	160 (73.7)	b) 0.002
	Exclusivo91(30.7)	34 (43.0)	57 (26.3)	
Desnutrição (n= 296)	Sim = 53 (17.9)	12 (15.2)	41 (19.0)	a)0.503
	Não= 243 (82.1)	67 (84.8)	176 (81.0)	
Duração Média (dias) das características clínicas				
	Media por n° crianças	Rotavirus +	Rotavirus –	
Febre	2.8	2.86	2.83	c)0,968
Diarreia	2.4	2.13	2.68	c) 0,011
Vómitos	1.9	1.82	2.07	c)0,308
Factores de risco				
		OR	IC 95%	
Tratamento de água (sim)		2.291	0.544-9.657	
Casa de banho (melhorada)		2.882	1.578-5.262	
Fonte de água (melhorada)		2.130	1.025-4.429	
Lavagem das mãos (sim)		1.855	0.587-5.856	

a)Foi utilizado o teste exacto de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

b)Foi utilizado o teste estatístico Qui-quadrado para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

c)Foi utilizado o teste estatístico T-Student para comparar valores médios e para determinar o valor de significância dos mesmos

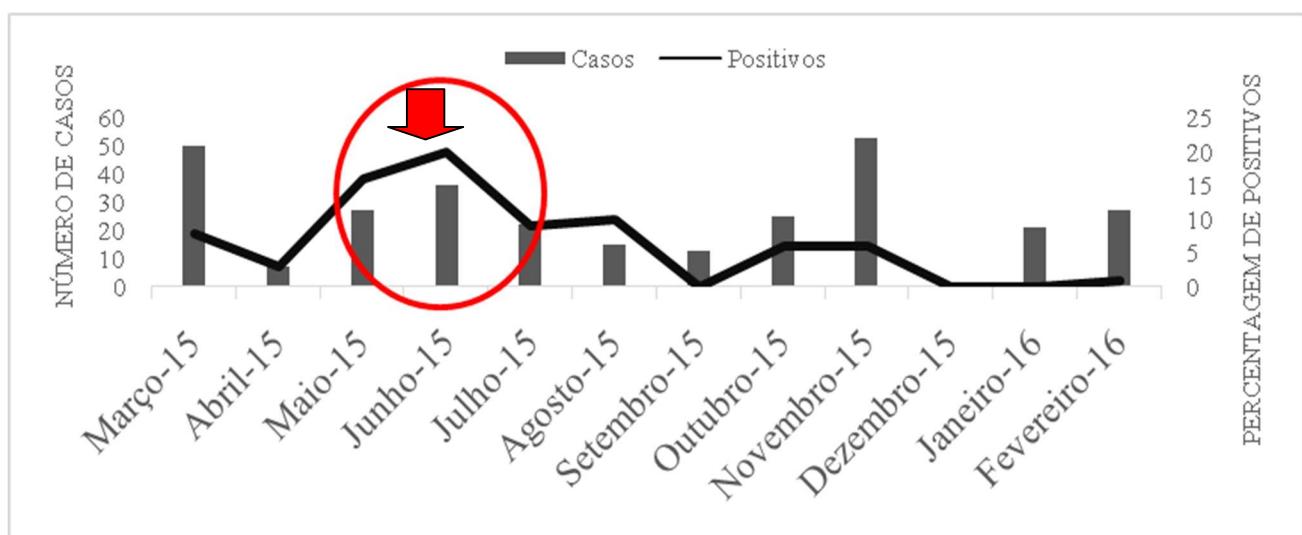


Figura 9. Distribuição de casos e positividade de Rotavirus ao longo do ano

7.1.2 Genotipagem de Rotavirus

7.1.3 Frequência de Genótipos G

Das 79 amostras positivas para Rotavirus conseguiu-se genotipar 93.7% (74/79) Para G (VP7). O genótipo mais frequente foi: G1 com 74% (58/79), G2 com 14% (11/79), G9 com 6% (5/79) e 6% não foi possível genotipar para G (5/79) .

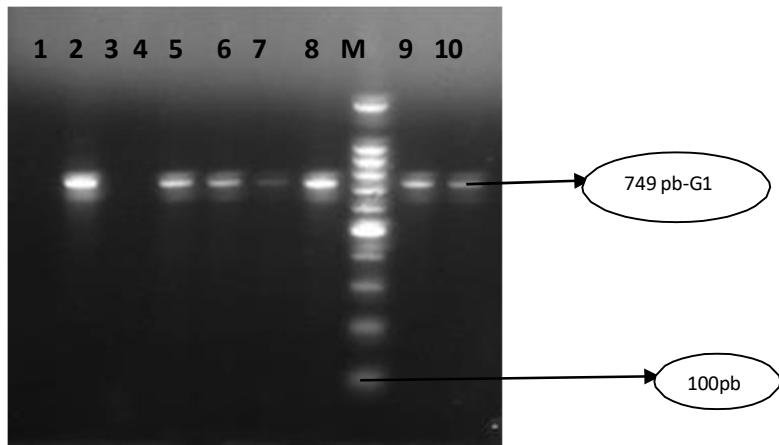


Figura 10. Produtos da 2^a reacção de multiplex PCR, para identificar os genótipos G de Rotavírus apartir da amplificação do fragmento genómico codificador da VP7. Pb = pares de base. Cada banda M = marcador de peso molecular no gel corresponde a 100 pares de base.

Legenda da figura 10: Amostras 1-controlo negativo (C-), 2-controlo Positivo (C+), 3-amostra não tipável (NT), 4;5;6;7;8;9 apresentaram tamanho de 749pb, correspondentes ao genotípico G1.

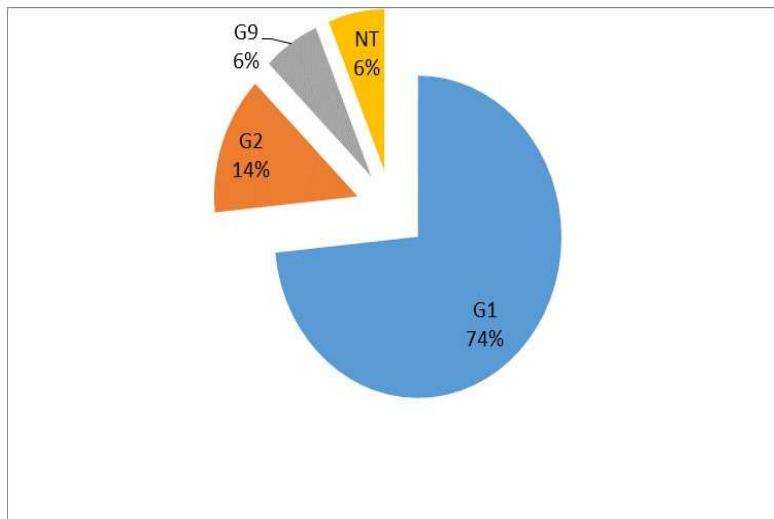


Figura 11. Representação gráfica da frequência dos genótipos G de Rotavirus identificados por multiplex PCR, em crianças <5 anos de idade em Nampula.

7.1.4 Frequência de Genótipos P

No total das 79 amostras positivas foi possível genotipar para P (VP4) 98.7% (78/79). Os genótipos P mais frequentes foram P[8] 80% (63/79) , [P6] 15% (12/79) , P[4] 4% (3/79), e 1% (1/79) não foi possível genotipar para P.

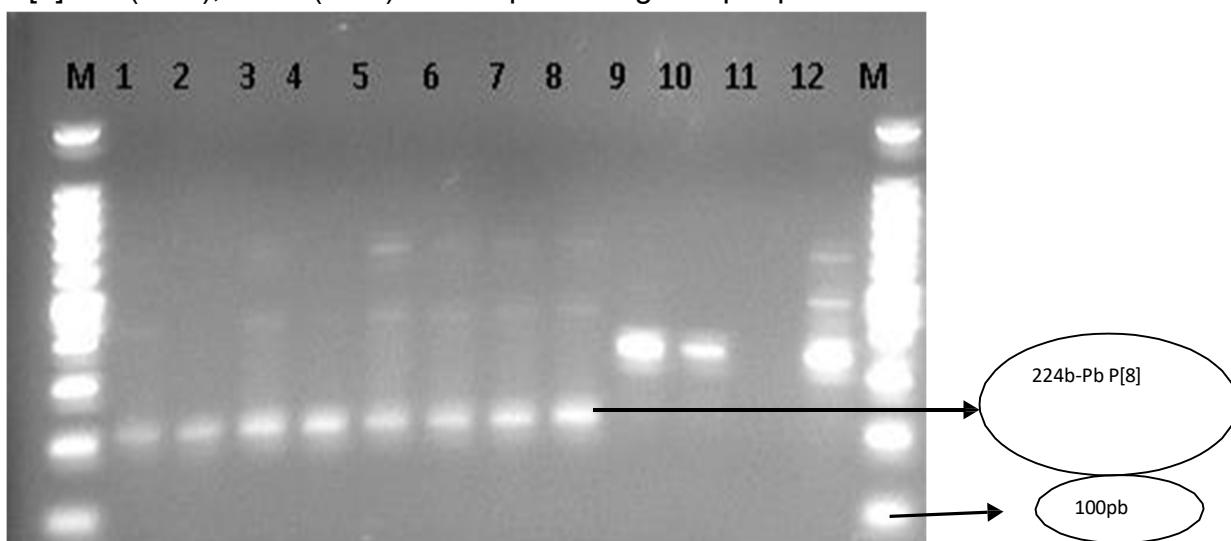


Figura 12. Produtos da 2^a reacção de multiplex PCR, para identificar os genótipos P de Rotavirus apartir da amplificação do fragmento genómico codificador da VP4. Pb

= pares de base. Cada banda M marcador de peso molecular no gel corresponde a 100 par pares de base.

Legenda da figura 12: Amostras 11-controlo negativo (C-), 12-controlo Positivo (C+), 1;2;3;4;5;6;7;8;9;10 apresentaram tamanho de 224pb, correspondentes ao genotípico P[8]

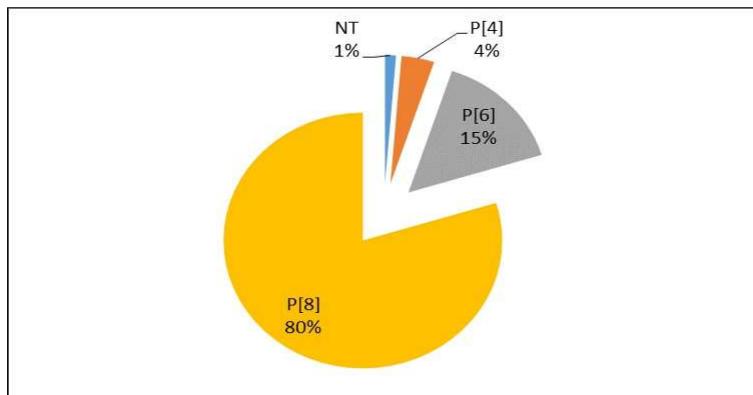


Figura 13. Representação gráfica da prevalência dos genótipos P de Rotavirus identificados por multiplex PCR, em crianças <5 anos de idade em Nampula.

7.1.5 Frequência da Combinação de genótipos G e P

Foi possível genotipar a combinação G/P em 93.7% (74/79). As combinações de genótipos G e P mais frequentes foram G1P[8] 57/74 (77,0%), G2P[6] 15,0% (11/74), G9P[4] 4% (3/74) e outras combinações de genotipos foram detectadas com menor frequência.

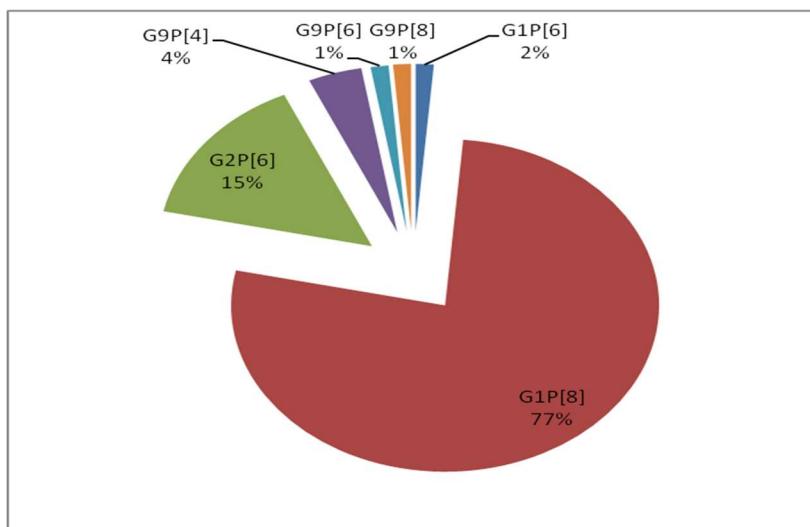


Figura 14. Representação gráfica da Combinação dos genótipos G e P de Rotavirus identificados por hemi-nested multiplex PCR, em crianças menores de 5 anos em Nampula 2015.

7.2 DISCUSSÃO

Neste estudo realizado na região norte do país, no Hospital Central de Nampula, registou-se uma frequência de infecção por Rotavirus de 26.7% em crianças com diarreia hospitalizadas com diarreia aguda. Na zona sul de Moçambique, estudo de prevalência realizado na zona urbana e rural (Maputo e Manhiça) foi obtida uma prevalência de 41.3% e 44.3% respectivamente (de Deus, 2017). O resultado do presente estudo é mais baixo, relativamente ao estimado pela OMS a nível global (36%) em crianças com menos de 5 anos de idade hospitalizadas devido a diarreia (Glass,2014).A frequência encontrada é inferior à descrita para África (40%) (Mwenda ,2018) apesar do estudo reflectir população de crianças hospitalizadas.

A Faixa etária que registou maior frequência de Rotavirus foi a dos 7-12 meses. Este resultado, igualmente foi reportado num estudo de prevalência de Rotavirus realizado no Quénia (Kiulia, 2014), que obteve registo de maior prevalência na faixa etária dos 7-12meses, estes resultados estão em concordância uma vez que apesar de a amamentação ser um factor protector da diarreia nesta faixa etária, a criança começa com a mobilidade e ingestão de produtos o que pode constituir factor de risco (Katayi ,2017).Alguns estudos demonstraram que a proteção contra Rotavirus pelo leite materno é eficaz quando este é dado regularmente. Em Moçambique o programa de saúde da mulher e criança do MISAU, recomenda o aleitamento materno exclusivo até aos 6 meses de idade (Yolken,1992).

A maior frequência de Rotavirus registou-se na época fria (inverno) devido a humidade relativa do ar que torna o Rotavirus mais viável. Um estudo realizado na zona sul do país reportou no distrito de Chokwe província de Gaza uma prevalência de 24% em 254 crianças, com uma maior frequência de Rotavirus na faixa etária 0-24 meses e o pico nos meses de Junho e Julho (Langa,2016). No presente estudo 29.1% de crianças Rotavirus positivo apresentaram febre contra 70.9% Rotavirus positivo sem febre, ambas com duração de 2.86 e 2.83 dias respectivamente; sendo que 72.2% das crianças com Rotavirus positivo apresentaram vômitos com duração de 1.82 dias contra 27.8% sem vômitos. O Rotavirus foi detectado em 43 % de crianças com alimentação exclusiva e 15.2% de desnutridos, a diarreia teve uma duração média de 2.13 dias em crianças Rotavirus positivo e 2.68 em crianças Rotavirus negativo. O tipo de casa de banho e a fontanário de água mostraram associação com ocorrência de Rotavirus enquanto que atitude de lavar as mãos, tratar água bem como o local de residência não evidenciou relação com a ocorrência de Rotavirus. Em Moçambique (Nhampossa,2015) verificou no seu estudo que apenas uma pequena proporção (6-9%) relatou tratar a água para o consumo. Mas dar água armazenada à criança aumentou a probabilidade de ocorrência de diarreia. Estes resultados sugerem que o tratamento de água potável pode estar sendo realizado de forma incorreta ou que o armazenamento da água tratada é feito em recipientes impróprios o que aumenta o risco de infecção mesmo depois de aplicado

um método de tratamento da água para o consumo (Nhampossa,2015). O estudo de prevalência realizado na Manhiça e Maputo obteve uma maior frequência na faixa etária de 6-11 meses, sendo sexo masculino o mais afectado, náuseas e vômitos em 72.4% dos casos de Rotavirus positivos e 52.9% para negativos, a febre em 35% de Rotavirus positivo e em 50.3% de negativos, 86.5% de casos positivos foram detectados na época fria (inverno) e 13.5% no verão (de Deus,2017).

No estudo caso controlo realizado por Krunkamp (2015) no Ghana revelou não haver diferença na frequência da febre tanto nos casos assim como nos controlos (82.8% e 72.5%), tendo registado 39.8% vômitos em crianças Rotavirus positivo e em relação a fonte de água para o consumo verificou-se que todas crianças infectadas por Rotavirus 41.1% não possuíam água canalizada de distribuição pública. Apesar do acesso a água melhorada para 58.9% os dados indicam que ainda persistia o risco de infecção por agentes causadores de diarreia incluindo o RVA em qualquer faixa etária (Kotloff,2013; Baker,2013).

Grande parte das amostras foi genotipada para combinação binária G e P 93.7% (74/79) e os genótipos mais frequentes foi a combinação G1[P8] 77%, G2P[6] 15% e G9[P4] 5%. O estudo realizado na Manhiça detectou G2P[4] (42.3%) como mais frequente (João et al., 2018) enquanto que um outro estudo realizado em Chokwé detectou genótipos G12P[8] (57%); G1P[8] (9%);G12P[6] (6%) como os mais frequentes (Langa,2016). A distribuição mundial dos genótipos, segundo estudo realizado em 2005, os mais frequentes são o G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8], que respondem por 88,5% das diarreias causadas por Rotavirus em todo o mundo (Santos ,2005).

Em África os genótipos G1 e P[8] individualmente apresentam prevalências de 28,8% e 40,6%, respectivamente e apenas cerca de um quinto das infecções é atribuível ao genótipo G1P[8] (Todd,2018);(Nyaga, 2016). Entre 2007 e 2011, a prevalência média do genótipo P[6] circulante em África foi de 30,9% com grandes flutuações anuais e por áreas geográficas, registando-se valores superiores a 60%, em 2007, no Sul de África e na África Ocidental e em 2011 na África Central (Nyaga,2016). Em África, estima-se que no período de 2007-2011, nos 16 países Africanos da rede ARSN, o genótipo P[6] tenha estado implicado em 4,9% das infecções diarreicas.

Pela técnica multiplex PCR, não foi possível genotipar apenas 1% das amostras positivas ao ELISA. Outros estudos realizados em África, reportaram entre 10-30% de amostras não tipadas. A não tipagem das amostras pode-se dever provavelmente à acumulação de mutações pontuais no local de hibridação dos primers e à diversificação de linhagens específicas de primers usados (Gentsch, 2005). Segundo a African Rotavirus Surveillance Network (ARN) em 11 países Africanos (2006-2008) encontraram-se 30% de amostras não tipáveis (Mwenda,2010). No presente estudo uma das 79 amostras não foi genotipada devido à incapacidade de obter produto nas primeira e segunda reacções de PCR.

Em 4 de Setembro 2015, com o apoio da Aliança Global para Vacinas e imunizações

(GAVI), Moçambique introduziu no programa nacional de vacinação a vacina contra Rotavirus.

Em Nampula, considerando os resultados de genotipagem obtidos neste trabalho, teoricamente a vacina monovalente Rotarix® G1P[8] conferirá protecção contra as estirpes circulantes. A nível global, os ensaios clínicos realizados demonstraram que duas vacinas monovalente e pentavalente apresentam níveis idênticos de segurança e eficácia (Soares-Weiser, 2012). Porém, nos países de baixa renda a eficácia da vacina é marcadamente mais reduzida (39% a 77%) que nos países industrializados (80% a 98%) (Patel, 2011). Uma das questões que poderá estar relacionada com este resultado é a diversidade das estirpes de Rotavirus que circulam nestes países.

8. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

8.1 CONCLUSÕES

- ✓ A frequência de RVA neste estudo foi de 26,7%;
- ✓ O Rotavirus está presente ao longo de todo ano, com maior incidência na época fria (nos meses de Maio, Junho e Julho);
- ✓ A faixa etária mais afectada foi a de crianças menores de 24 meses;
- ✓ O sexo masculino foi o mais afectado com 53.2%
- ✓ A combinação binária de genótipos mais frequente foi G1P[8] (77%).

8.2 RECOMENDAÇÕES

Na sequência deste trabalho de linha de base para a província de Nampula, recomenda-se:

- ✓ Continuar com vigilância para estimar a eficácia da vacinação contra Rotavirus introduzida em Setembro de 2015 na prevenção de infecção pelo Rotavirus;
- ✓ Monitorização contínua das estirpes de Rotavirus circulantes em Nampula;
- ✓ Sequenciar as amostras genotipadas das proteínas VP4 e VP7 para obtenção da filogenia;
- ✓ Introduzir a metodologia de ELISA em Nampula como rotina para o diagnóstico de Rotavirus;
- ✓ Monitorar a dinâmica da infecção viral permitindo uma melhor compreensão e conhecimento da alternância de genótipos ao longo dos anos;
- ✓ Investigar outros vírus entéricos, tais como: Astrovirus, Adenovirus e Norovirus, por meio de metodologias moleculares e identificar casos de co-infecção com RVA.
- ✓

9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnold, M. M., Barro, M., & Patton, J. T. (2013). Rotavirus NSP1 Mediates Degradation of Interferon Regulatory Factors through Targeting of the Dimerization Domain, 87(17), 9813–9821.

Bishop, R., Davidson, G. P., Holmes, I. H., & Ruck, B. J. (1973). VIRUS PARTICLES IN EPITHELIAL CELLS OF DUODENAL MUCOSA FROM CHILDREN WITH ACUTE NON-BACTERIAL GASTROENTERITIS. *The Lancet*, 302(7841), 1281–1283.

Castello, A. A., Argu, M. H., Rota, R. P., Olthoff, A., Jiang, B., Glass, R. I., Glikmann, G. (2006). Molecular Epidemiology of Group A Rotavirus Diarrhea among Children in Buenos Aires , Argentina , from 1999 to 2003 and Emergence of the Infrequent Genotype G12, 44(6), 2046– 2050.

de Deus, N., João, E., Cuamba, A., Cassocera, M., Luís, L., Acácio, S., Page, N. (2017).Epidemiology of Rotavirus Infection in Children from a Rural and Urban Area, in Maputo, Southern Mozambique, before Vaccine Introduction. *Journal of Tropical Pediatrics*, (September 2015), 1–5.

Estes, M. K., & Cohen, J. (1989). Rotavirus Gene Structure and Function, 53(4), 410–449.

GAVI Alliance. (2012). The GAVI Alliance: Accelerating Africa's access to Rotavirus Vaccine,20. Retrieved from gavi_rotavirus_infographic.pdf-2011.

Greenberg, H. B., & Estes, M. K. (2009). Rotaviruses : From Pathogenesis to Vaccination. *YGAST*, 136(6), 19391951.

Halstead, F. D., Lee, A. V, Couto-parada, X., Polley, S. D., Ling, C., Jenkins, C., Manuel, R. J. (2018). Universal extraction method for gastrointestinal pathogens, (2013), 1535–1539. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.058743-0>.

H.G.PEREIRA, R.S.AZEREDO, J.P.G.LEITE, O.M.BARTH, F.SUTMOLLER, FARIAS, V. D., & M.N.P.VIDAL. (1983). COMPARISON OF POLYACRILAMIDE GEL ELECTROFORESIS (PAGE),IMMUNO-ELECTRON MICROSCOPY(IEM) AND ENZYME IMMUNOASSAY (EIA) FOR THE RAPID DIAGNOSIS OF ROTAVIRUS INFECTION IN CHILDREN. RIO DE JANEIRO-BRAZIL.

Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Farag, T. H., Panchalingam, S., Levine, M. M. (2013). 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. *The Lancet*, 382(9888), 209–222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2).

Langa, J. S., Thompson, R., Arnaldo, P., Resque, H. R., Rose, T., Enosse, S. M., Leite, J. P. G. (2016). Epidemiology of rotavirus A diarrhea in Chókwè, Southern Mozambique, from February to September, 2011. *Journal of Medical Virology*, 88(10), 1751–1758. <https://doi.org/10.1002/jmv.24531>.

Mandomando, I. M., Macete, E. V, Ruiz, J., Sanz, S., Abacassamo, F., Vallès, X., Gascon, J. (2007). Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(3), 522–7.

Mwenda, J. M., Ntoto, K. M., Abebe, A., Enweronu-laryea, C., Amina, I., Mchomvu, J., Steele, A. D. (2018). Burden and Epidemiology of Rotavirus Diarrhea in Selected African Countries : Preliminary Results from the African Rotavirus Surveillance Network, 202(January), 5–11. <https://doi.org/10.1086/653557>.

Nhampossa, T., Mandomando, I., Acacio, S., Quintó, L., Vubil, D., Ruiz, J., Alonso, P. (2015). 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*, 10(5), 12–23.

Patel, M., Shane, A. L., Parashar, U. D., Jiang, B., Gentsch, J. R., & Glass, R. I. (2009). Oral Rotavirus Vaccines : How Well Will They Work Where They Are Needed Most ?, 2220, 39–48. <https://doi.org/10.1086/605035>.

Prasad, B. V. V., Wang, G. J., Clerx, J. P. M., & Chiu, W. (1988). Three-dimensional structure of rotavirus. *Journal of Molecular Biology*, 199(2), 269–275.

Ramig, R. F. (2004). MINIREVIEW Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection, 78(19), 10213–10220. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10213>.

Santos, N., & Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol*, 15(October 2004), 29–56.

Santos, N., Volotão, E. M., Soares, C. C., Campos, G. S., Sardi, S. I., & Hoshino, Y. (2005). Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: Implications for future vaccine strategies. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 4064–4069. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4064-4069.2005>

Steele, A. D., Neuzil, K. M., Cunliffe, N. A., Madhi, S. A., Bos, P., Ngwira, B., Han, H. H. (2012). Human rotavirus vaccine Rotarix™ provides protection against diverse circulating rotavirus strains in African infants: a randomized controlled trial. *BMC Infectious Diseases*, 12(1), 213. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-213>.

Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Parashar, U. D., Agocs, M., Serhan, F., Paladin, F. (2016). Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. *Clinical Infectious Diseases*, 62(Suppl 2), S96–S105. <https://doi.org/10.1093/cid/civ1013>.

Ward, R. L., McNeal, M. M., & Steele, A. D. (2008). Why does the world need another rotavirus vaccine ?, 4(1), 49–63.

WHO. (2009). Manual of rotavirus detection and characterization methods Manual of rotavirus detection and characterization methods Immunization , Vaccines and Biologicals.

Yolken, R. H., Peterson, J. A., Vonderfecht, S. L., Fouts, E. T., Midthun, K., &

Newburg, D. S. (n.d.). Human Milk Mucin Inhibits Rotavirus Replication and Prevents Experimental Gastroenteritis.

FLUXOGRAMA DE ACTIVIDADES

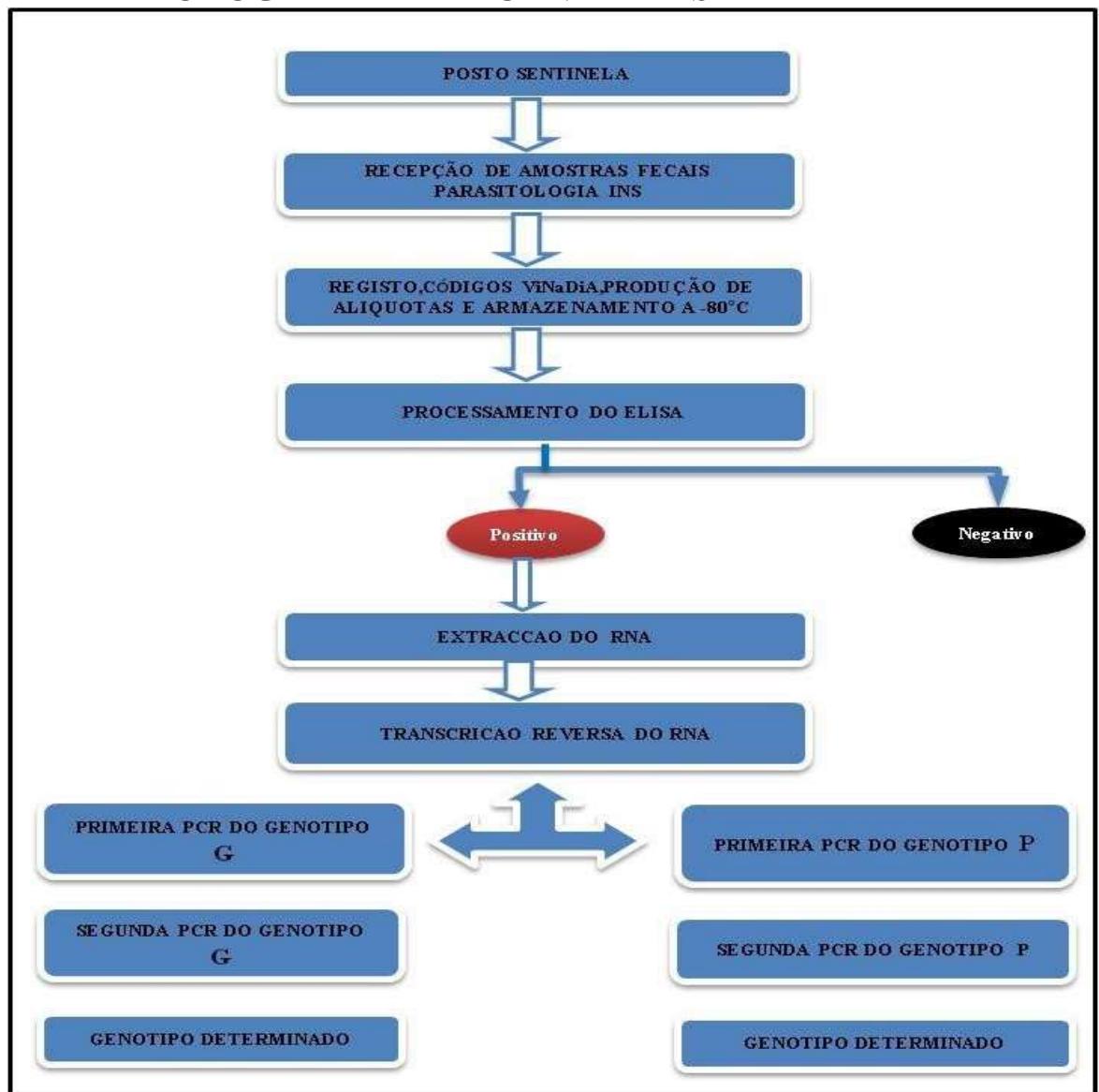


Figura 15. Fluxograma do procedimento usado no estudo desde a colheita de amostras no posto sentinel até o Laboratório do INS para Processamento. ELISA, PCR e Genotipagem.