

AUDREY CILLI CHIRELLI

**Padronização, implantação e caracterização  
molecular de sapovírus em amostras de  
pacientes com gastroenterites**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: **Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky

SÃO PAULO

2020

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Chirelli, Audrey Cilli

Padronização, implantação e caracterização molecular de sapovirus em amostras de pacientes com gastroenterites/ Audrey Cilli Chirelli. – 2020.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof(a). Dra. Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky.

1. Sapovirus.
2. Gastroenterite.
3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real.
4. Monitoramento epidemiológico.
5. Análise de sequencia de RNA.

SES/CCD/CD - 424/2020

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

*O período de maior ganho em conhecimento e experiência é  
o período mais difícil da vida de alguém.*

**Dalai Lama**

## DEDICATÓRIA

À meu amado esposo, Izaniel, pelo amor incondicional, paciência e incentivo nesta jornada.

Às minhas queridas filhas Giovanna e Gabriela, razão do meu viver e da minha felicidade.

Aos meus pais, Antonio e Nadia, por minha vida, dedicação e incentivo em todos os momentos.

Às minhas irmãs, Simone e Alessandra, e sobrinhas, Giulia e Beatrix, que trazem mais alegria para minha vida.

À minha avó Clementina, por seu carinho e preocupação.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus por me guiar e iluminar em todos os momentos de minha vida.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky, minha orientadora desde o início de minha formação profissional, por transmitir seus conhecimentos e pelo incentivo à minha pesquisa.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Luchs, pela contribuição e apoio dedicados à este trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiana Cristina Pereira dos Santos, minha sincera gratidão pelo apoio e contribuição nesta jornada.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cecília Luiza Simões Santos, pelos ensinamentos transmitidos durante a execução desta tese.

À MSc. Ana Paula de Torres Santos, agradeço o apoio e todas as conversas enriquecedoras.

À MSc. Adriana Yurika Maeda, pela contribuição e auxílio na execução desta tese.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Compagnoli Carmona, pelo apoio e oportunidade de realização desta tese.

Aos amigos do Núcleo de Doenças Entéricas: Simone, Cleusa, Antonio, Bráulio, Gisele, Isabela, Dieli, Gabriela, Ellen, Laís, Yasmin e Roberta pelo apoio e colaboração para a realização desta tese.

À Sirlene Henrique Rodrigues que tanto me incentivou, por sua amizade incondicional.

Às amigas do Projeto Vacina de Dengue: Heloísa, Rhaíssa, Cibele e Maíra por seu carinho e apoio.

Aos colegas do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz que de diferentes formas colaboraram na realização deste tese.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo-PPG-CCD-SES/SP, pelos ensinamentos transmitidos.

À todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo-PPG-CCD-SES/SP, pelas orientações prestadas.

Agradeço à CAPES pelo apoio.

Enfim, meu agradecimento à todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

## RESUMO

No mundo são registrados 1,7 bilhões de casos de doença diarreica aguda (DDA) por ano, sendo considerada a segunda maior causa de morte em crianças menores de 5 anos de idade. Após a introdução da vacina contra rotavírus (RVA) em diversos países do mundo e o aprimoramento das técnicas de diagnóstico molecular, outros vírus emergiram como importantes causadores de DDA, como os sapovírus (SaV), sendo frequentemente associados à surtos e casos esporádicos em adultos e crianças. No Brasil, pouco se sabe sobre a ocorrência do SaV e seu impacto em Saúde Pública. O presente estudo teve por objetivo a padronização, implantação e caracterização molecular de SaV em amostras de fezes de pacientes com gastroenterite. Foram selecionadas amostras negativas para RVA, norovírus e adenovírus entéricos, totalizando 3974 amostras coletadas de pacientes de 0 a 91 anos, provenientes das regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil. Os ensaios de PCR convencional e rRT-PCR foram padronizados para implantação no diagnóstico laboratorial dos SaV. Os SaV foram detectados em 149 (3,7%) das amostras analisadas: a faixa etária de 0 a 2 anos foi a mais acometida (5,7%). Este foi o primeiro estudo a detectar SaV no estado de SP, com detecção expressiva no ano de 2016 (8,9%). A variabilidade genotípica dos SaV nas amostras estudadas foi detectada após a análise de sequência parcial da VP1: genogrupo GI (GI.1, GI.2, GI.3, GI.6), genogrupo GII (GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.5) e genogrupo GIV (GIV.1). Neste estudo foram detectados 13 surtos de SaV, sendo que 12 deles ocorreram em crianças menores de 3 anos de idade. Os surtos identificados demonstram a importância do estudo dos SaV e seu monitoramento epidemiológico. Não há sistema de vigilância para gastroenterites causadas por SaV nos países em desenvolvimento, como o Brasil, causando subnotificações de casos esporádicos e surtos. Nossos dados sugerem a necessidade de implantação do diagnóstico de SaV nos programas de monitoramento de diarreia aguda.

**Palavras-chave:** Sapovirus, Gastroenterite, Reação em cadeia da polimerase em tempo real, Monitoramento epidemiológico, Análise de sequencia de RNA

## ABSTRACT

Worldwide, 1.7 billion cases of acute diarrheal disease are enrolled every year, and being considered the second leading cause of death in children under 5 years old. After the introduction of the rotavirus vaccine in many countries and the improvement of molecular diagnostic techniques, other virus have emerged as important causes of acute diarrhea, such as sapovirus (SaV), frequently associated with outbreaks and sporadic cases in adults and children. In Brazil, little is known about the incidence of SaV and its impact on Public Health. This study aimed to standardize, implement and molecular characterize SaV for gastroenteritis cases in fecal samples from patients with gastroenteritis. Selected samples tested negative to rotavirus, norovirus and enteric adenovirus, totaling 3974 were collected from patients aged 0 to 91 years, from Southeast, South and Midwest regions of Brazil. Convencional PCR and rRT-PCR were performed to implement SaV in laboratory diagnosis. SaV was detected in 149 (3.7%) of the analyzed samples: the 0 to 2 years age group was the most affected (5.7%). This is the first detection of SaV in the São Paulo State, showing significant detection in 2016 (8.9%). The genotypic variability of SaV samples were detected after analyse of VP1 partial sequencing: GI genogroup (GI.1, GI.2, GI.3, GI.6), GII genogroup (GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.5) and GIV genogroup (GIV.1). In this study, 13 outbreaks of SaV were detected, 12 of which occurred in children under 3 years old. The outbreaks identified demonstrate the importance of SaV study and their epidemiologic monitoring. There is no surveillance system for gastroenteritis caused by SaV in developing countries, such as Brazil, causing sporadic and outbreaks underreporting. Our data suggest the need to implement the diagnosis of SaV in programs of monitoring acute diarrhea.

**Key-Words:** Sapovirus, Gastroenteritis, Real time polymerase chain reaction, epidemiologic monitoring, RNA sequence analysis

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|          |  |
|----------|--|
| µL       | Microlitro   |
| AA       | Aminoácidos  |
| AdV      | Adenovírus entérico                                      |
| BLAST    | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>                 |
| CaV      | Calicivírus  |
| CE       | Estado do Ceará  |
| CN       | Controle negativo  |
| COX/PGE2 | Via ciclooxigenase/prostaglandina E2                     |
| CP       | Controle positivo  |
| Ct       | <i>Cycle Thershold</i>                                   |
| DDA      | Doença Diarreica Aguda                                   |
| DI       | Dose infecciosa  |
| DNA      | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido desoxirribonucleico |
| dNTP     | Desoxirribonucleotídeo Fosfatado                         |
| EBHSV    | Vírus da lebre marrom europeia                           |
| ELISA    | <i>Enzyme-Linked Immunsorbent Assay</i>                  |
| FCV      | Calicivírus de felino                                    |
| GO       | Estado de Goiás  |
| h        | hora   |
| HAstrV   | Astrovírus humano  |
| HCl      | Ácido clorídrico   |
| HEV      | Enterovírus humano                                       |
| HPeV     | Parechovirus   |
| Hu       | Humano   |
| IAL      | Instituto Adolfo Lutz                                    |
| ICCC     | <i>International Calicivirus Conference Committee</i>    |
| ICTV     | <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>    |
| IME      | Imunomicroscopia Eletrônica                              |
| IPTG     | Isopropil β-d-1-tiogalactopiranósido                     |
| kb       | Quilobyte  |

|                   |  |
|-------------------|--|
| kDa               | Quilodalton  |
| L                 | Litro  |
| MED               | Microscopia Eletrônica Direta  |
| MEGA              | <i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis</i>                       |
| Meio LB           | Meio de cultura Luria Bertani  |
| MET               | Microscopia eletrônica de transmissão                                |
| mg                | Miligrama  |
| MGB               | <i>Minor Groove Binder</i>   |
| MgCL              | Cloreto de Magnésio  |
| MgSO <sub>4</sub> | Sulfato de Magnésio  |
| mL                | Mililitro  |
| mM                | Milimolar  |
| MS                | Ministério da Saúde  |
| MS                | Estado de Mato Grosso do Sul   |
| MT                | Estado de Mato Grosso  |
| NBV               | Vírus Newbury-1  |
| NDE               | Núcleo de Doenças Entéricas  |
| NFQ               | Quencher não fluorescente  |
| ng                | Nanograma  |
| NGS               | <i>Next Generation Sequencing</i> - Sequenciamento de Última Geração |
| NJ                | <i>Neighbor Joining</i>  |
| NLV               | <i>Norwalk-like virus</i>  |
| nm                | Nanômetro  |
| nM                | Nanomolar  |
| NoV               | Norovírus  |
| NS                | Proteína não estrutural  |
| NTC               | <i>No template control</i>   |
| NTPase            | Nucleosídeo trifosfatase   |
| °C                | Graus Celsius  |
| OMS               | Organização Mundial da Saúde   |
| ORF               | <i>Open Reading Frame</i> – Região de Leitura Abertura               |

|         |  |
|---------|--|
| PA      | Estado do Pará   |
| pb      | Pares de bases   |
| PB      | Estado de Paraíba  |
| PE      | Estado de Pernambuco   |
| pH      | Potencial hidrogênico  |
| PI      | Estado do Piauí  |
| PMDDA   | Programa de Monitoramento das Doenças Diarreicas Agudas  |
| pmol    | Picomoles  |
| Po      | Suíno  |
| PoSav   | Sapovírus suíno  |
| PR      | Estado de Paraná   |
| R2      | Coefficiente de correlação   |
| RdRp    | RNA-polimerase RNA-dependente  |
| RHDV    | Vírus da doença hemorrágica em coelhos   |
| RNA     | <i>Ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucleico   |
| rpm     | Rotações por minuto  |
| rRT-PCR | Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real   |
| RT-PCR  | Transcrição Reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase   |
| RVA     | Rotavírus  |
| SaV     | Sapovírus  |
| SC      | Estado de Santa Catarina   |
| SLV     | <i>Sapporo-like virus</i>  |
| SP      | Estado de São Paulo  |
| SRSV    | <i>Small round-structured virus</i>  |
| TaqMan® | <i>Probe</i> específica marcada com agente fluorescente (FAM) responsável por sinalizar a amplificação do fragmento alvo |
| Tm      | Temperatura de <i>Melting</i>  |
| TO      | Estado de Tocantins  |
| TRO     | Terapia de reidratação oral  |
| V       | Voltz  |
| VESV    | Vírus do exantema vesicular de suínos  |
| VP      | Proteína viral   |

|       |   |
|-------|---|
| VPg   | Proteína viral ligada ao genoma                             |
| WGOGG | <i>World Gastroenterology Organisation Global Guideline</i> |
| X g   | Força centrífuga  |
| X-gal | 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo    |

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Microscopia eletrônica de transmissão de partículas de sapovírus. Nesta imagem pode-se visualizar a conformação de estrela de Davi, característica dos vírus da família <i>Caliciviridae</i> (adaptado de Oka, et al., 2015). Escala da barra = 100nm..... | 25 |
| <b>Figura 2:</b> Mapa mostra a localização da cidade de Sapporo, Japão. Cidade que deu nome ao novo vírus causador de diarreia aguda na década de 1980. Imagem obtida com uso do site Google Maps.....  | 27 |
| <b>Figura 3:</b> Representação do genoma dos sapovírus destacando as 2 ORF's e as proteínas estruturais e não-estruturais (adaptado Oka et al., 2015).....  | 29 |
| <b>Tabela 1.</b> Proteínas do genoma de sapovírus codificadas e suas principais características.....  | 30 |
| <b>Figura 4.</b> A) Representação de uma quimera de sapovírus apresentando os domínios S e P, e subdomínios P1 e P2 (Fonte: Miyazaki et al. 2016, com modificações).....  | 31 |
| <b>Tabela 2:</b> Lista dos principais representantes dos genogrupos de sapovírus e seus números de acesso no <i>GenBank</i> .....   | 32 |
| <b>Tabela 3:</b> Distribuição dos genogrupos de sapovírus animais.....  | 40 |
| <b>Tabela 4:</b> Características gerais dos estudos de identificação e caracterização molecular de sapovírus em amostras de fezes no Brasil.....  | 45 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 5.</b> Mapa do Brasil: em destaque estão os Estados de Mato Grosso (MT), Tocantins (TO), Goiás (GO), Mato Grosso do Sul (MS), São Paulo (SP), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e o Distrito Federal (DF) das regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil que fazem parte do PMDDA e têm o NDE-IAL como centro de referência macrorregional para a vigilância das gastroenterites virais. .... | 54 |
| <b>Quadro 1.</b> Combinação dos <i>primers</i> testados para a detecção molecular das amostras de sapovírus por RT-PCR convencional.....  | 57 |
| <b>Tabela 5.</b> Sequência dos <i>primers</i> testados para a detecção molecular do sapovírus por RT-PCR convencional.....  | 58 |
| <b>Tabela 6.</b> <i>Primers</i> e <i>probes</i> utilizados na rRT-PCR para sapovírus. Tabela extraída de Oka e colaboradores, 2006.....   | 62 |
| <b>Figura 6.</b> Representação do vetor pGEM-T Easy (Promega) do kit <i>pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I</i> (Promega). Fonte: site <a href="https://www.promega.com.br/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360">https://www.promega.com.br/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360</a> .....  | 69 |
| <b>Tabela 7.</b> Comparação de testes de PCR convencional utilizando diferentes <i>primers</i> para detecção de SaV.....  | 71 |
| <b>Figura 7.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,2% referente à amplificação de um fragmento de aproximadamente 420pb do gene do capsídeo dos SaV estudados, utilizando os <i>primers</i> SV-F21/SV-R2. PM: peso molecular 100pb; Canaletas 1 a 7: amostras suspeitas de sapovírus; CP: Controle Positivo de SaV; CN: Controle Negativo.....   | 72 |

**Figura 8.** Perfil da absorbância emitida durante cada ciclo no ensaio de rRT-PCR para o CP de sapovírus utilizando diferentes kits de *master mix*. Neste gráfico as linhas vermelhas representam a amostra de CP em duplicata feita com o reagente *SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR* e as linhas verdes, o CP em duplicata feito com o reagente *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System*. Equipamento utilizado: ABI7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). Os resultados do teste foram interpretados pelo software ABI7500 v2.0.6..... 73

**Figura 9.** Perfil logarítmico da absorbância emitida durante cada ciclo no ensaio da curva de concentração decrescente para o protocolo de rRT-PCR do CP de sapovírus. Neste gráfico estão incluídas as amostras puras e diluições log 5 para a análise da precisão das medidas. Equipamento utilizado: ABI7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). Os resultados do teste foram interpretados pelo software ABI7500 v2.0.6..... 74

**Figura 10.** Curva padrão de eficiência para o ensaio de rRT-PCR para SaV, analisado no equipamento ABI7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA)..... 74

**Tabela 8.** Resultados da avaliação do desempenho do ensaio de rRT-PCR para sapovírus..... 75

**Tabela 9.** Resultados dos testes de repetibilidade do ensaio de rRT-PCR para sapovírus, analisado no equipamento ABI7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA)..... 77

**Tabela 10.** Resultados dos casos discordantes entre os ensaios de *nested* RT-PCR e rRT-PCR para sapovírus..... 78

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 11.</b> Apresentação da taxa de detecção de sapovírus em amostras provenientes das regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste no período de 2010 a 2017.....   | 79 |
| <b>Tabela 12.</b> Distribuição das amostras positivas para sapovírus no Estado de São Paulo, no período de 2010 a 2017.....   | 79 |
| <b>Tabela 13.</b> Distribuição das amostras positivas para SaV de acordo com a faixa etária de pacientes das regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste no período de 2010 a 2017.....   | 80 |
| <b>Tabela 14:</b> Apresentação dos surtos de sapovírus ocorridos no estado de São Paulo no período de 2010 a 2017.....  | 81 |
| <b>Figura 11.</b> Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP1 de sapovírus genótipo GI.1 gerada com o software BioEdit (Ibis Therapeutics, EUA). As sequências de referência foram obtidas a partir do <i>GenBank</i> .....  | 83 |
| <b>Figura 12.</b> Árvore genealógica do tipo <i>Neighbor-Joining</i> (NJ) das sequências nucleotídicas parciais da VP1 dos sapovírus do genótipo GI.1 gerada com software MEGA 6.0. Os números 1, 2, 3 e 6 representam os genótipos geneticamente distintas. As amostras sequenciadas neste estudo estão marcadas com setas. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de <i>bootstrap</i> estão localizados nos nós dos ramos..... | 86 |
| <b>Figura 13.</b> Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP1 de sapovírus genótipo GI.2 (verde), GI.3 (rosa) e GI.6 (amarelo) gerada com o software BioEdit (Ibis Therapeutics, EUA). As sequências de referência foram obtidas a partir do <i>GenBank</i> .....  | 88 |

**Figura 14.** Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequencias nucleotídicas parciais da VP1 dos sapovírus do genótipo GI.2, GI.3 e GI.6 gerada com software MEGA 6.0. Os números 1, 2, 3 e 6 representam os genótipos geneticamente distintas. As amostras sequenciadas neste estudo estão marcadas com setas. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos..... 91

**Figura 15.** Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP1 de SaV genogrupo GII gerada com o *software BioEdit* (IbisTherapeutics, EUA). As sequências de referência foram obtidas a partir do *GenBank*..... 93

**Figura 16.** Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequencias nucleotídicas parciais da VP1 dos SaV do genogrupo GII gerada com software MEGA 6.0. Os números 1 a 5 representam as genótipos geneticamente distintos. As amostras sequenciadas neste estudo estão marcadas com seta. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados próximos aos nós dos ramos..... 94

**Tabela 15.** Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP1 de SaV genogrupo GIV gerada com o *software BioEdit* (IbisTherapeutics, EUA). As sequências de referência foram obtidas a partir do *GenBank*..... 95

**Figura 17.** Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequencias nucleotídicas parciais da VP1 dos SaV do genogrupo GIV gerada com software MEGA 6.0. As cepas sequenciadas neste estudo estão marcadas com a seta. A escala indica a diversidade genética. 96

Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.....

**Figura 18.** Eletroforese em gel de agarose 1,2% referente à amplificação do DNA plasmidial de sapovírus com aproximadamente 420pb. PM: peso molecular 100pb; Canaletas 1 a 9: DNA plasmidial de SaV; CP: Controle Positivo de SaV; CN: Controle Negativo..... 97

**Figura 19.** Perfil logarítmico da absorbância emitida durante cada ciclo no ensaio da curva de concentração decrescente para o protocolo de rRT-PCR do clone de sapovírus. Neste gráfico estão incluídas as diluições de  $10^{12}$  a  $10^5$ . Equipamento utilizado: ABI7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). Os resultados do teste foram interpretados pelo software ABI7500 v2.0.6..... 98

**Tabela 16.** Resultados da avaliação das diluições seriadas ( $10^{12}$  a  $10^5$ ) do clone de SaV..... 98

# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                               | <b>21</b> |
| 1.1. História da Família <i>Caliciviridae</i> .....     | 24        |
| 1.2. Estrutura dos Sapovírus.....                       | 28        |
| 1.3. Classificação dos Sapovírus.....                   | 31        |
| 1.4. Características Físico-Químicas dos Sapovírus..... | 34        |
| 1.5. Replicação Viral.....                              | 34        |
| 1.6. Patogênese dos Sapovírus.....                      | 35        |
| 1.7. Transmissão e Manifestações Clínicas.....          | 36        |
| 1.8. Imunidade.....                                     | 37        |
| 1.9. Prevenção e Tratamento.....                        | 38        |
| 1.10. Sapovírus Animal.....                             | 39        |
| 1.11. Diagnóstico dos Sapovírus.....                    | 41        |
| 1.12. Epidemiologia.....                                | 43        |
| 1.13. Sapovírus no Brasil.....                          | 45        |
| <br>  |           |
| <b>2. RELEVÂNCIA.....</b>                               | <b>49</b> |
| <br>  |           |
| <b>3. OBJETIVO.....</b>                                 | <b>51</b> |
| 3.1. Objetivos Específicos.....                         | 51        |
| <br>  |           |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                       | <b>53</b> |
| <br>  |           |
| <b>4.1. MATERIAIS.....</b>                              | <b>53</b> |
| 4.1.1. Amostragem.....                                  | 53        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1.2. Controle Positivo.....   | 55        |
| 4.1.3. Suspensão Fecal.....   | 55        |
| <b>4.2. MÉTODOS.....</b>  | <b>56</b> |
| 4.2.1. Extração de RNA.....   | 56        |
| 4.2.2. Padronização da RT-PCR convencional.....                                 | 57        |
| 4.2.3. Fotodocumentação em gel de agarose.....                                  | 59        |
| 4.2.4. <i>Screening</i> das amostras com suspeita de gastroenterite.....        | 60        |
| 4.2.5. Padronização da rRT-PCR.....   | 60        |
| 4.2.6. Validação do ensaio de rRT-PCR.....                                      | 63        |
| 4.2.7. Análise estatística.....   | 64        |
| 4.2.8. Avaliação da RT-PCR convencional em relação ao rRT-PCR.....              | 64        |
| 4.2.9. Sequenciamento e Análise.....  | 64        |
| 4.2.9.1. Purificação do produto da PCR.....                                     | 64        |
| 4.2.9.2. Quantificação do produto da PCR após a purificação.....                | 65        |
| 4.2.9.3. Reação de sequenciamento.....  | 65        |
| 4.2.9.4. Purificação e precipitação do produto da reação de sequenciamento..... | 66        |
| 4.2.9.5. Método de purificação Acetato-Etanol.....                              | 66        |
| 4.2.9.6. Método de purificação por colunas de centrifugação.....                | 67        |
| 4.2.9.7. Análise das sequencias de nucleotídeos.....                            | 67        |
| 4.2.9.8. Números de acesso das sequencias no <i>GenBank</i> .....               | 68        |
| 4.2.9.9. Clonagem dos Sapovírus.....  | 68        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>   | <b>71</b> |
| 5.1. Padronização da RT-PCR convencional.....                                   | 71        |
| 5.2. <i>Screening</i> das amostras com suspeita de gastroenterite.....          | 72        |
| 5.3. Padronização e validação da rRT-PCR.....                                   | 73        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.3.1. Ensaio de eficiência da rRT-PCR para Sapovírus.....                                      | 73         |
| 5.3.2. Ensaios de sensibilidade, especificidade e repetibilidade da rRT-PCR para Sapovírus..... | 76         |
| 5.4. Avaliação da RT-PCR convencional em relação ao rRT-PCR.....                                | 77         |
| 5.5. Análise dos dados de Sapovírus no Brasil encontrados neste estudo.....                     | 78         |
| 5.6. Sequenciamento.....  | 82         |
| 5.6.1. Genogrupo GI.....  | 82         |
| 5.6.2. Genogrupo GII.....   | 92         |
| 5.6.3. Genogrupo GIV.....   | 95         |
| 5.7. Resultado da clonagem de Sapovírus.....  | 96         |
| <br>  |            |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>100</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO.....</b>  | <b>114</b> |
| <br>  |            |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>116</b> |

## *INTRODUÇÃO*

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), por ano são registrados no mundo 1,7 bilhões de casos de doença diarreica, e 525.000 crianças menores de 5 anos de idade morrem por causa de diarreia, principalmente nos países em desenvolvimento (OMS, 2017). De todas as mortes de crianças por diarreia, 78% ocorrem no Continente Africano e Regiões do Sudeste da Ásia (Farthing et al, 2012).

Globalmente, a diarreia aguda é a segunda causa de morte (depois da pneumonia) entre crianças com menos de 5 anos de idade. Tanto a incidência como o risco de mortalidade por patologia diarreica são maiores entre os meninos deste grupo etário, particularmente em menores de 1 ano (WGOGG, 2012, OMS, 2017).

A mortalidade associada à diarreia tem diminuído aproximadamente 65% desde a década de 90, principalmente pelas melhorias das condições sanitárias e de fornecimento de água potável e redução da desnutrição infantil (GBD, 2015). Esforços para implantação de intervenções eficazes como o uso de vacinas tem sido metas a longo prazo para diminuição da mortalidade por diarreia no mundo.

As doenças diarreicas agudas (DDA) correspondem a um grupo de doenças infecciosas gastrointestinais. São caracterizadas por uma síndrome em que há ocorrência de no mínimo três episódios de diarreia aguda em 24 horas, ou seja, diminuição da consistência das fezes e aumento do número de evacuações, quadro que pode ser acompanhado de náusea, vômito, febre e dor abdominal. Em geral, são doenças autolimitadas com duração de até 14 dias. Em alguns casos, há presença de muco e sangue, quadro conhecido como disenteria. Dependendo do agente causador da doença e de características individuais dos pacientes, as DDA podem evoluir clinicamente para quadros de desidratação que variam de leve a grave (WGOGG, 2012).

As DDA podem ser infecciosas ou não infecciosas: infecciosas causadas por vírus, bactérias e suas toxinas, parasitas ou não infecciosas causadas por intolerância alimentar, sais mal absorvidos, ácidos biliares (após ressecção ileal), gorduras não absorvidas, medicamentos, hormônios peptídicos produzidos por tumores pancreáticos (MS, 2017).

Segundo o Ministério da Saúde (MS), a notificação de casos individuais de DDA é compulsória em unidades sentinelas para Vigilância Epidemiológica de DDA que realizam o Programa de Monitoramento das Doenças Diarreicas Agudas (PMDDA). A ocorrência de, no mínimo, dois casos com o mesmo quadro clínico de diarreia num mesmo local é considerado possível surto e, se ocorrer após ingestão do mesmo alimento ou água da mesma origem caracteriza-se como surto de doença transmitida por água/alimento. O aumento do número de casos de DDA acima do limite esperado para a população envolvida, naquele período e localidade indica alteração do padrão e deve ser investigado (MS, 2017).

A morbidade por diarreia permaneceu relativamente constante durante as duas últimas décadas, com crianças menores de 5 anos de idade experimentando uma média de três episódios de diarreia anuais. A terapia de reidratação oral (TRO) e as melhorias nutricionais provavelmente têm um impacto muito maior sobre as taxas de mortalidade do que sobre a incidência de diarreia. Intervenções como a amamentação e melhora no saneamento devem afetar a mortalidade e morbidade simultaneamente (Farthing et al, 2008). O estudo das diarreias e seus agentes etiológicos são de suma importância para a realização de políticas públicas em todos os países do mundo.

Nos países em desenvolvimento, a maioria dos casos de gastroenterite tem como agente etiológico os vírus. Patógenos virais causam surtos de gastroenterites em comunidades e, também, em instituições fechadas, como asilos, creches e hospitais. Diversos vírus já foram identificados como causadores de gastroenterites, dentre eles os mais detectados mundialmente

são os rotavírus (RVA), norovírus (NoV), sapovírus (SaV), astrovírus humano (HAstrV) e adenovírus entérico (AdV) (Xavier et al, 2009).

Historicamente, os RVA são os agentes etiológicos mais comumente detectados em pessoas com gastroenterite de todas as idades ao redor do mundo (Parashar, 2009). A OMS recomendou que a vacina contra RVA deveria ser incluída nos programas de vacinação da Europa e América em 2006, e estendeu essa recomendação à todas as regiões do mundo em 2009 (OMS, 2009). Após a introdução da vacina em diversos países do mundo, incluindo o Brasil, e o aprimoramento das técnicas de diagnóstico molecular, os calicivírus (CaV) humanos (NoV e SaV) emergiram como importantes causadores de diarreia, sendo frequentemente associados à surtos e casos esporádicos em adultos e principalmente, crianças (Lanata et al., 2013).

No entanto, apesar da identificação destes patógenos ter aumentado substancialmente nos últimos anos por causa de avanços das técnicas de diagnóstico molecular e, principalmente, da metagenômica, a causa de muitos casos de diarreia continua sem diagnóstico. Tam e colaboradores (2012), compararam dois estudos realizados no Reino Unido nos anos de 1993-1996 e 2008-2009, que utilizavam definição de caso e metodologias semelhantes para definir a etiologia dos casos de gastroenterite. Diversos agentes foram pesquisados, como: bactérias, protozoários e vírus, entretanto, em 60.2% dos casos não foi possível a identificação do patógeno causador.

A rotina de testes laboratoriais que normalmente é utilizada para detectar dos vírus causadores de gastroenterite aguda, não é capaz de identificar o agente etiológico em cerca de 30 a 50% de casos (Dennehy et al., 2011).

Segundo o *World Gastroenterology Organisation Global Guideline* (2012), o SaV pode ser o segundo agente viral mais comum depois do RVA, responsável por 4–19% dos episódios de gastroenterite aguda em crianças.

### 1.1. História da Família *Caliciviridae*

Em 1976, após introdução da microscopia eletrônica direta (MED), Madeley e Cosgrove (1976) e Flewett e Davies (1976) foram os primeiros grupos a encontrar CaV de origem humana em fezes de crianças com gastroenterite. Inicialmente, os CaV eram classificados como pertencentes à família *Picornaviridae*. Com base em seus estudos e de outras pesquisas, Burroughs e Brown (1974) propuseram a criação da família *Caliciviridae* devido aos vírus apresentarem características estruturais, morfológicas e principalmente filogenéticas diferentes dos picornavírus, como tamanho, densidade e composição das partículas virais. Em 1979, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) aprovou a criação da família *Caliciviridae*, na época composta por um único gênero, *Calicivirus*. O nome dessa família deriva da palavra *calix* do latim que significa cálice ou taça, devido a seu capsídeo viral ser composto por 32 depressões em forma de taça em sua superfície, dispostos em simetria icosaédrica (Figura 1). Estes vírus apresentam-se com a configuração de Estrela-de-Davi, ou seja, à MED têm morfologia clássica, sendo por isso, também denominados de CaV humanos clássicos.

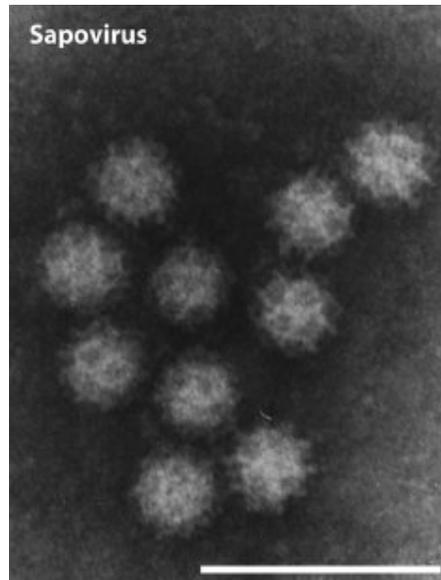


Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão de partículas de sapovírus. Nesta imagem pode-se visualizar a conformational de estrela de Davi, característica dos vírus da família *Caliciviridae* (adaptado de Oka, et al., 2015). Escala da barra = 100nm.

Em 1929, o pediatra Dr. Zahorsky, usou pela primeira vez a expressão “*winter vomiting disease*” para descrever casos esporádicos de uma doença súbita e autolimitada, que ocorria geralmente durante o inverno e tinha como principais sintomas a diarreia e vômito. Em 1968, houve um surto de gastroenterite em uma escola de ensino primário na cidade de Norwalk, Ohio, EUA, afetando crianças e professores. Este surto apresentou as mesmas características descritas por Zahorsky em 1929. Entretanto, na época, estudos laboratoriais não foram capazes de identificar o agente etiológico envolvido (Adler e Zick, 1969). Em 1972, Kapikian e colaboradores, identificaram por imunomicroscopia eletrônica (IME), partículas de aproximadamente 27 nm de diâmetro, com características semelhantes à vírus nas fezes que haviam sido estocadas à época do surto e de amostras de indivíduos que ingeriram filtrados de fezes. O então nomeado, *Norwalk-like virus*, foi o primeiro vírus descrito associado à casos de diarreia aguda em humanos (Wyatt et al., 1974; Chiba et al., 1979; Dolin et al., 1982; Leers et al., 1987; Lambden et al., 1993; Jiang et al., 1995).

Posteriormente, outros vírus com morfologia pequena e arredondada, denominados *small round-structured virus* (SRSV), similares aos encontrados por Kapikian e colaboradores (1972), foram associados à outros casos e surtos de diarreia aguda. Estes agentes infecciosos foram denominados de acordo com a localidade em que foram primeiramente descritos, como por exemplo: Hawaii, Montgomery County, Snow Mountain, Southampton, Toronto e México. No entanto, o *Norwalk-like virus* (NLV) permaneceu como protótipo dos SRSVs pois foi primeiramente descrito (Wyatt et al., 1974; Chiba et al., 1979; Dolin et al., 1982; Leers et al., 1987; Lambden et al., 1993; Jiang et al., 1995).

O SaV foi primeiramente nomeado após sua descoberta em um surto de gastroenterite em orfanato na cidade de Sapporo, Japão, em outubro de 1977 (Figura 2). Partículas virais com morfologia semelhante foram detectadas em surtos no mesmo orfanato entre os anos de 1977 e 1982, subsequentemente (Chiba et al., 2000). Estas partículas tinham a configuração de “estrela de Davi” na MED e eram antigeneticamente idênticas por IME. Inicialmente, estas amostras foram classificadas como *Calicivirus* ou *Sapporo-like virus* por MED, mas o posterior sequenciamento do genoma viral mostrou que os vírus pertenciam à um gênero diferente, denominado *Sapovirus*, da família *Caliciviridae*. A amostra protótipo do gênero *Sapovirus* foi obtida neste surto (Hu/SaV/Sapporo/1982/JPN) (Nakata et al, 2000, Chiba et al., 2000, Numata et al., 1997, Oka et al., 2015).

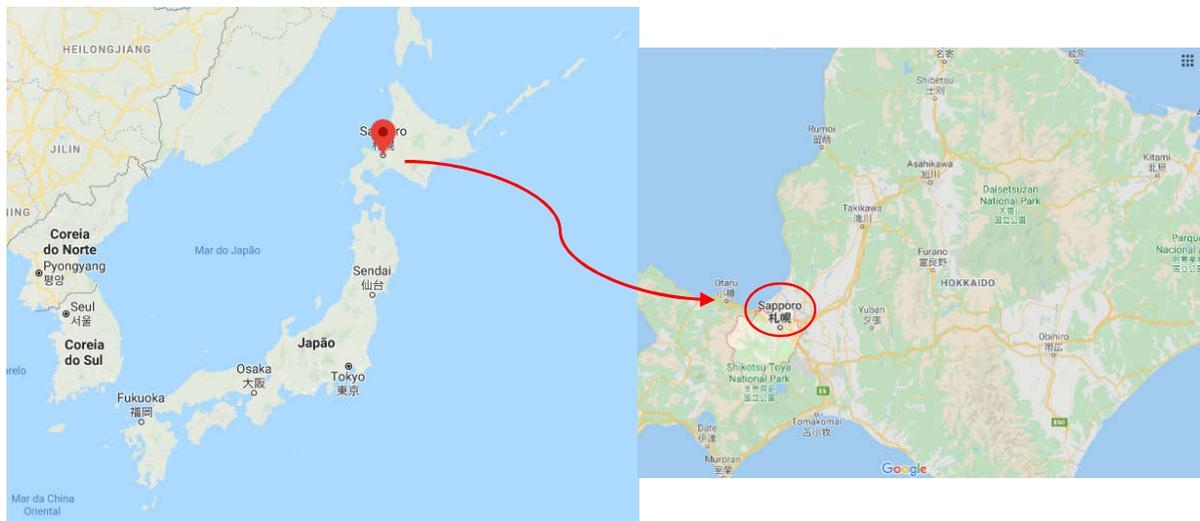


Figura 2: Mapa mostra a localização da cidade de Sapporo, Japão. Cidade que deu nome ao novo vírus causador de diarreia aguda na década de 1980. Imagem obtida com uso do site Google Maps.

Em 1998, o ICTV aprovou a proposta de criação de mais dois gêneros na família *Caliciviridae*, o gênero *Norwalk-like virus* (NLV), tendo como espécie protótipo o vírus *Norwalk* e o gênero *Sapporo-like virus* (SLV), com o vírus *Sapporo* como protótipo (Green et al., 2000). Somente em 2005, o ICTV renomeou o gênero *Norwalk-like virus* classificando-o como *Norovirus* e o gênero *Sapporo-like virus* como *Sapovirus*.

Atualmente, a família *Caliciviridae* é composta por cinco gêneros assim denominados: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Nebovirus*, *Lagovirus* e *Vesivirus*. Os gêneros *Norovirus* e *Sapovirus* são os únicos descritos que infectam humanos, causando diarreia aguda. Os três últimos são CaV de importância veterinária: *Nebovirus*, representado pelo vírus Newbury-1 (NBV), que causa diarreia em bovinos; *Lagovirus*, representado pelo vírus da doença hemorrágica em coelhos (RHDV), e vírus da lebre marrom europeia (EBHSV); e *Vesivirus*, representado pelo CaV de felinos (FCV) e vírus do exantema vesicular de suínos (VESV) (Glass et al., 2009)

## 1.2. Estrutura dos Sapovírus

O SaV é um vírus RNA de fita simples, sem envoltório, de 30 a 35 nm de diâmetro, simetria icosaédrica e polaridade positiva com uma cauda poli-A na extremidade 3' do transcrito. Seu RNA genômico tem aproximadamente 7,1 a 7,7 kb, contendo de 2 a 3 *Open Reading Frames* (ORFs) (Oka et al., 2016, Li et al., 2017).

A ORF1 codifica uma proteína estrutural que é a maior proteína do capsídeo viral, denominada VP1 com aproximadamente 60 kDa e, uma poliproteína que é clivada em 7 proteínas não estruturais (NS1 a NS7). Ela é responsável pela formação da estrutura do capsídeo do vírus além de possuir um papel crítico na interação com as células do hospedeiro. A ORF 2, por sua vez, codifica a menor proteína estrutural (VP2), porém sua função é desconhecida. A ORF3 codifica uma proteína com função desconhecida, que apresenta uma sequência conservada de iniciação da tradução sugerindo uma proteína funcional. A ORF3 é somente encontrada em algumas amostras de humanos e morcegos (Tse et al, 2012; Svraka et al, 2010; Oka et al. 2016). Os genogrupos GI, GIV e GV contêm três ORFs, enquanto o genogrupo GII e GIII, contêm apenas duas ORFs (Figura 3).

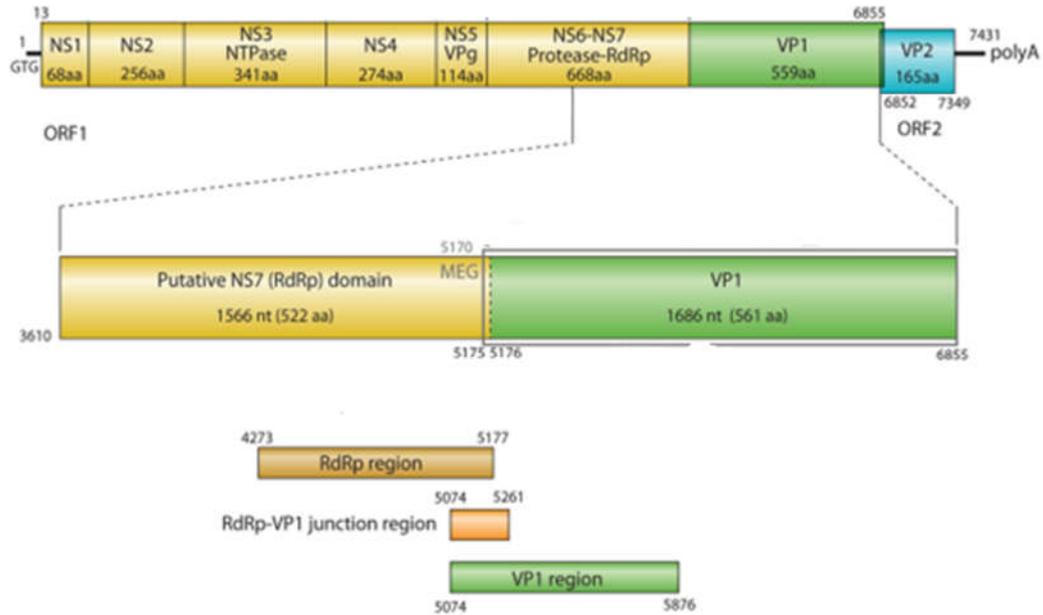


Figura 3: Representação do genoma dos sapovírus destacando as 2 ORF's e as proteínas estruturais e não-estruturais (adaptado Oka et al., 2015).

Dentre as proteínas não-estruturais, apenas as NS3, NS5 e NS6-NS7 possuem função genômica conhecida. A Tabela 1 apresenta as funções e características das proteínas do genoma do SaV (Sosnovtsev et al. 2006, Oka et al. 2016).

Tabela 1. Proteínas do genoma de sapovírus codificadas e suas principais características.

| Segmento | Aminoácidos (AA) | Proteína | Função  | Características                 |
|----------|------------------|----------|---|---------------------------------|
|          | 68               | NS1      | Desconhecida  |                                 |
|          | 256              | NS2      | Desconhecida  |                                 |
|          | 341              | NS3      | NTPase  | Nucleosídeo trifosfatase        |
|          | 274              | NS4      | Desconhecida  |                                 |
|          | 114              | NS5      | VPg   | Proteína viral ligada ao genoma |
| ORF1     |                  | NS6      | Cisteíno-protease   | Ligada à replicação viral       |
|          | 668              | NS7      | RdRp (RNA polimerase RNA-dependente)                      | Ligada à replicação viral       |
|          | 559              | VP1      | Formação da estrutura do capsídeo, interação vírus-célula | Principal proteína do capsídeo  |
| ORF2     | 165              | VP2      | Desconhecida  | Menor proteína do capsídeo      |

O capsídeo do SaV é formado por 180 moléculas de VP1, estruturadas em 90 dímeros, que formam dois domínios principais: domínio S (*shell*) “concha” e o domínio P (*protruding*) “saliente”, assim como um braço N-terminal. Estes dois domínios são unidos por uma região de dobradiça flexível. O domínio S é mais conservado e sua forma protege o genoma do RNA viral. O domínio P, que é conectado ao domínio S pela região da dobradiça,

subdivide-se em dois subdomínios P1 e P2, que através de interações entre si revelam o formato característico de cálice. O subdomínio P2 também é responsável pela interação com os receptores das células hospedeiras (Figura 4) (Chen et al. 2004, Miyazaki et al. 2016).

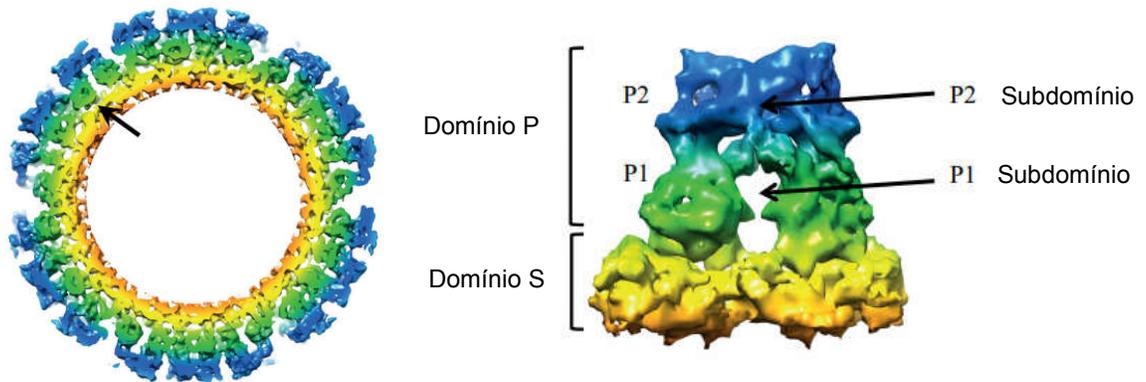


Figura 4. A) Representação de uma quimera de sapovírus apresentando os domínios S e P, e subdomínios P1 e P2 (Fonte: Miyazaki et al. 2016, com modificações).

### 1.3. Classificação dos Sapovírus

Baseando-se na sequência completa do gene do capsídeo, VP1, os SaV são classificados em 15 genogrupos, GI a GXV, dentre os quais somente os genogrupos GI, GII, GIV e GV são detectados em humanos (Liu et al., 2016, Oka et al., 2016, Varela et al., 2019, Li et al., 2017). Os genogrupos de SaV foram subdivididos em 18 genótipos. Os genogrupos de SaV humanos, GI e GII foram subdivididos em sete e oito genótipos, respectivamente (GI.1 a GI.7 e GII.1 a GII.8) (Oka et al., 2015, Tsinda et al., 2017, Xue et al., 2019). GIV apresentou um único genótipo (GIV.1) e GV foi subdividido em dois genótipos (GV.1 e GV.2) (Tabela 2). Há também uma proposta de novo

genótipo GII.NA relatado recentemente (Diez-Valcarce et al., 2019). Dentre eles, os genótipos GI e GII são os mais prevalentes detectados no mundo enquanto que os outros grupos são raramente detectados (Magwalivha et al., 2018). Embora o genótipo GIV seja raro, foi responsável por 1/3 dos casos de gastroenterite aguda em crianças no Japão em 2007 (Harada et al., 2009). Este genótipo tem sido identificado em fezes de crianças no mundo todo, como por exemplo, no Paquistão em 1992 (Phan et al., 2004). O genótipo GV, raramente identificado, foi encontrado em amostras de crianças na Argentina em 1995 (Farkas et al., 2004).

O ICCC (*International Calicivirus Conference Committee*) preconiza que para designação de novos genótipos e genogrupos seja realizado o sequenciamento completo da VP1 dos SaV. Sequências parciais de regiões da polimerase e da VP1 são utilizadas para caracterizar os SaV detectados, bem como para analisar sua similaridade em estudos epidemiológicos (Kitajima et al. 2010a; Bucardo et al., 2014; Liu et al., 2015).

Tabela 2: Lista dos principais representantes dos genogrupos de sapovírus e seus números de acesso no *GenBank*.

| <b>Sapporo vírus</b>          | <b>Acesso<br/>GenBank</b> | <b>Abreviações</b> |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------|
| GI [Hu/Sapporo/1982/JP]       | [U65427]                  | (GI-SaV)           |
| GI [Hu/Manchester/1993/UK]    | [X86560]                  | (GI-Man)           |
| GII [Hu/London 29845/1992/UK] | [U95645]                  | (GII-Lon)          |
| GII [Hu/Bristol/1998/UK]      | [AJ249939]                | (GII-Bristol)      |
| GIII [Po/PEC Cowden]          | [AF182760]                | (GIII-Cowden)      |
| GIII [Po/SaV1/2008/CHN]       | [FJ387164]                | (GIII-SaV1)        |
| GIV [Hou7-1181/1990/US]       | [AF435814]                | (GIV-Houston)      |

|                                  |            |                   |
|----------------------------------|------------|-------------------|
| GIV [Hu/Angelholm/SW278/2004/SE] | [DQ125333] | (GIV-Angelholm)   |
| GV [Hu/Arg39/1995/ARG]           | [AY289803] | (GV-Arg39)        |
| GV [NongKhai-24/THA]             | [AY646856] | (GV-NongKhai24)   |
| GVI* [Po/OH-JJ681/2000/US]       | [AY974192] | (GVI-OH-JJ681)    |
| GVI* [Po/OH-LL26/2002/US]        | [AY974195] | (GVI-OH-LL26)     |
| GVII* [Mk/MEC/1/1999/US]         | [AF338404] | (GVII-MEC/1/1999) |
| [Po/43/06-18p3/06/ITA†]          | [EU221477] | (43/06-18p3)      |
| [Po/2053P4/Brazil†]              | [DQ359100] | (2053P4)          |
| [Po/F19-10/CANT†]                | [FJ498786] | (F19-10)          |

\*Tabela adaptada do site ICTV: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/253/caliciviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/253/caliciviridae)

Abreviações dos hospedeiros: Hu = humano, Po = suíno. A sequência do genoma de Sapporo virus é parcial, portanto, a primeira sequência completa do genoma de SaV é a Manchester vírus.

Cepas de SaV com grupos discordantes na região da VP1 e da RdRp podem ser classificados como recombinantes (Li et al., 2017, Katayama et al., 2004, Kuroda et al., 2017). As recombinações aparecem com mais frequência entre a junção RdRp-VP1, e podem alterar a patogenicidade e virulência das cepas resultantes. Recombinações intra e intergenogrupos são relatadas frequentemente (Dos Anjos et al., 2011, Tohma et al., 2020, Kumthip et al., 2020). Baseando-se na sequência da VP1, todas as amostras identificadas com recombinação intergenogrupo pertencem ao genogrupo GIV, e formam o cluster com amostras GII na região da RdRp (Oka et al., 2015, Farkas et al., 2004, Hansman et al., 2005a). Até o momento, recombinações intragenogrupo tem sido relatadas nos genogrupos GI (Phan et al., 2006, Dey et al., 2011) e GII (Kumthip et al., 2020, Nguyen et al., 2008, Katayama et al., 2004) em

humanos. Co-infecções com diferentes cepas de SaV também tem sido relatadas e representam uma pré-condição para ocorrer uma recombinação viável de SaV (Kuroda et al., 2017, Makhaola et al., 2020).

A caracterização molecular dos SaV é baseada principalmente na amplificação parcial da VP1. No entanto, para determinarmos novos genogrupos ou genótipos é necessária a sequência completa da VP1 (Oka et al., 2015).

#### **1.4. Características Físico-Químicas dos Sapovírus**

Os SaV suínos submetidos à tratamento físico-químico possuem uma estabilidade em pH 3,0 a 8,0 em temperatura ambiente por 1 h; sensibilidade a etanol variando de 60% a 70% em temperatura ambiente por 30 segundos. O título viral é reduzido com tratamento por 200 mg/L de hipoclorito de sódio a temperatura ambiente durante 30 minutos ou por aquecimento a 56°C por 2 horas (Wang et al. 2012).

#### **1.5. Replicação Viral**

Os fatores exatos que compreendem a replicação do SaV ainda não foram determinados, mas acredita-se que sejam os mesmos ou similares à replicação de outros CaV. O processo de replicação dos CaV é rápido, havendo detecção de novas partículas poucas horas após à infecção (Green et al., 2013).

A entrada do vírus na célula hospedeira se dá por ligação aos receptores específicos, que mediam a endocitose do vírus. Então, ocorre o desnudamento e o lançamento do RNA genômico no citoplasma. No citoplasma, a VPg é removida do RNA viral e por interação com a maquinaria da célula, inicia a tradução do material genético (Gutierrez-Escolano et al., 2000; Goodfellow et al., 2005). A ORF1 é traduzida em poliproteína, que é

clivada em proteínas não estruturais NS1-NS7 e na VP1. As ORFs 2 e 3 são traduzidas nas proteínas estruturais VP2 e VP3. Por fim, ocorre o empacotamento, a montagem das partículas virais e liberação por lise celular (processos ainda não esclarecidos para o SaV) (Green et al., 2013).

## **1.6. Patogênese dos Sapovírus**

Embora diversas tentativas de propagar o SaV humano em culturas de células tenham sido realizadas, e estudos descreverem a propagação de SaV em células de rim de macaco verde e células primárias humanas, não há confirmação da reprodução destes dados. Somente algumas amostras de SaV suínos, principalmente a amostra Cowden, tiveram sucesso no crescimento em cultura de células com suplemento de ácidos biliares para induzir sinais intracelulares que permitissem a replicação viral, podendo ser estudados em relação à patogênese em suínos gnotobióticos (Oka et al., 2015). Portanto, devido à ausência de um sistema eficiente de cultivo celular para SaV humano, a patogênese deste vírus está baseada em estudos em voluntários humanos ou da cepa de SaV que infecta suínos (PoSaV Cowden) ou ainda, estudos com o NoV murino (GV) ou outros CaV de animais capazes de se propagarem em cultivo celular (Kapikian et al., 1972, Straub et al., 2007, Green et al., 2013).

A dose infecciosa (DI) dos CaV pode variar entre as cepas, mas estima-se que de 10<sup>15</sup> a 2800 cópias do genoma já seriam suficientes para iniciar uma infecção (Teunis et al., 2008). Devido à sua semelhança com os CaVs, especula-se que os SaV também possam ter baixa dose infectante, mas outros estudos são necessários para confirmar esta consideração.

Alguns calicivirus, como os NoV humanos demonstram padrões de ligação ou restrição dependentes dos grupos sanguíneos ABO e do fenótipo de Lewis no processo de infecção (Rydell et al., 2011). Entretanto, segundo Bucardo e colaboradores (2012), a suscetibilidade ao SaV humano não está associada aos fenótipos de grupo sanguíneo ABO, fenótipo de Lewis ou

genótipos secretores. Até o momento, nenhum fator genético humano para suscetibilidade ou resistência à infecção por SaV foi identificado.

A infecção por CaV resulta em algumas alterações histológicas na morfologia da mucosa intestinal, pois afetam as células das vilosidades intestinais havendo aumento do embotamento das vilosidades, encurtamento dos microvilos, vacuolização citoplasmática, edema intracelular e apoptose dos enterócitos. Isto ocorre, pois os CaV possuem propriedades ácido-resistentes mantendo sua atividade infecciosa mesmo após passagem pelo estômago (Green et al., 2013). Alguns estudos notaram que há aumento no número de linfócitos T citotóxicos CD8+, sugerindo que a ação citotóxica destas células e a ação da replicação viral, podem estar associadas à redução das células das vilosidades intestinais. Estas alterações promovem a diarreia, pois comprometem a absorção de água e íons (Troeger et al., 2008).

### **1.7. Transmissão e Manifestações Clínicas**

A principal via de transmissão do SaV é fecal-oral e frequentemente está associada à ingestão de água e alimentos contaminados, contato com superfície, e também por contato direto com a pessoa infectada (Torner et al., 2016). O período de incubação do vírus varia de 1 a 4 dias. Os principais sintomas clínicos são diarreia e vômito, entretanto indivíduos também podem apresentar náusea, dor abdominal, dor de cabeça, mialgia, e raramente, febre. Normalmente, a diarreia dura o período máximo de 1 semana, entretanto, há alguns relatos de indivíduos que apresentaram sintomas por até 20 dias (Nakata et al., 1985, Sakai et al., 2001, Johansson et al., 2005). Embora a diarreia causada por SaV seja geralmente leve, casos de diarreia aguda que necessitam de hospitalização também podem ocorrer (Robinson et al, 2002, Oka et al., 2015). Casos de indivíduos assintomáticos também já foram observados (Akihara et al., 2005, Bucardo et al., 2012, Chhabra et al., 2013). O SaV chegou a ser detectado nas fezes de indivíduos de 1 a 4 semanas após o final da gastroenterite (Iwakiri et al., 2009).

A mortalidade por SaV é rara, mas foi relatada em um idoso hospitalizado devido à surto de SaV ocorrido em asilo no estado do Oregon, Estados Unidos da América (Lee et al., 2012).

O SaV ocorre em pessoas de todas as idades, embora seja mais frequentemente encontrado em crianças do que em adultos. Podem ocorrer casos esporádicos ou surtos principalmente em locais fechados como creches, pré-escolas, escolas, hospitais, enfermarias, restaurantes, hotéis e navios (Oka et al., 2015). Alguns surtos de transmissão alimentar também foram relatados, como o surto ocorrido no Japão em 2010, em que 665 pessoas foram diagnosticadas com diarreia por SaV após ingerirem lanche contaminado (Kobayashi et al., 2012).

O SaV também foi detectado em águas ambientais (águas de rios, águas residuais e águas de esgoto) causando risco à populações expostas à água contaminada (Kitajima et al., 2010).

As co-infecções com outros vírus entéricos que causam gastroenterite, incluindo RVA, NoV, HAstrV, AdV, enterovirus (HEV) e parechovirus (HPeV) é relatada em diversos estudos (Kumthip et al., 2020, Diez-Valcarce et al., 2019, Harada et al., 2009).

Em relação à sazonalidade, o SaV é detectado no hemisfério Norte nas estações mais frias do ano, embora picos de sazonalidade sejam relatados durante todo o ano. Em países como a África do Sul (Page et al., 2016), Malawui (Dove et al., 2005) e Quênia (Nakata et al., 1998) por exemplo, o SaV é detectado durante todo o ano.

Em relação ao Brasil, não temos este dado bem estabelecido.

## **1.8. Imunidade**

Estudos soropidemiológicos de infecções por SaV humanos sugerem que a taxa de soroprevalência aumenta gradualmente com a idade, podendo atingir um nível elevado (>90%) em crianças em idade escolar, e mantendo-se elevada (80 a 100%) no soro de adultos (Nakata et al., 1985, Farkas et al.,

2006, Bucardo et al., 2012). Esta afirmação sugere que o SaV é comum na primeira infância.

Os mecanismos de imunidade e resistência à infecção por SaV ainda precisam ser melhor estudados, mas a presença de anticorpos contra SaV preexistentes no soro de indivíduos está claramente associado à baixa frequência da doença, ao menos para os anticorpos contra SaV geneticamente homólogos (Nakata et al., 1985).

As reinfecções sintomáticas com diferentes genogrupos ou genótipos foram relatadas por Harada e colaboradores (2012). Neste estudo, 2 pacientes de 10 e 27 meses de idade foram reinfectedados por SaV de diferentes genogrupos, sugerindo que a imunidade protetora contra SaV pode ser no mínimo genogrupo-específica ou que a imunidade não dure por um longo período de tempo.

Vacinas contra SaV não tem sido estudadas, pois há escassez de informação sobre a patogênese e imunidade, além de ausência de sistema de cultivo *in vitro* eficiente para este vírus (Green et al. 2013, Debbink et al. 2014).

### **1.9. Prevenção e Tratamento**

A prevenção de surtos de gastroenterite aguda causados por SaV dependem da identificação do modo de transmissão. A implantação de medidas de controle da contaminação dos alimentos ou água é a única forma de interromper a transmissão viral. Em caso de contaminação por alimentos, os manipuladores de alimentos devem ser instruídos em relação às medidas de higiene corretas para o preparo dos alimentos. Se o manipulador estiver contaminado, é recomendado seu afastamento por no mínimo 3 dias após a resolução dos sintomas e, para evitar a transmissão pessoa a pessoa, adultos e crianças infectados devem ser mantidos afastados das atividades escolares e de trabalho pelo mesmo período de tempo (CDC, 2011).

Medidas básicas de higiene como lavar as mãos com água e sabão, principalmente após o uso do banheiro e troca de fralda de bebês e, antes do preparo das refeições, podem diminuir os riscos de infecção por SaV e por outros vírus causadores de gastroenterites. Alimentos como frutas e verduras devem ser bem lavados e, moluscos cozidos completamente. As superfícies de preparo de alimento devem ser desinfetadas e os utensílios de cozinha, toalhas e uniformes devem ser lavados (CDC, 2011). Após um surto viral, interromper o funcionamento de estabelecimentos como navios de cruzeiro, resorts, acampamentos e restaurantes é a medida necessária para evitar a exposição da população (Patel et al., 2009).

As infecções causadas por SaV resultam, em sua maioria, casos de diarreia que se resolvem sem maiores complicações. Quando o indivíduo é acometido por desidratação grave, há a recomendação de reposição oral ou intravenosa de líquidos e eletrólitos. Nenhum tipo de medicamento é necessário nestes casos.

#### **1.10. Sapovírus animal**

O SaV tem sido detectado em humanos e vários animais como suínos (Guo et al., 1999), visons (Guo et al., 2001), cachorros (Li et al., 2011a), leões marinhos (Li et al., 2011b), morcegos (Tse et al., 2012), chimpanzés (Mombo et al., 2014) e ratos (Firth et al., 2014), listados em ordem de descobrimento (Tabela 3).

O SaV suíno (PoSaV) é o SaV animal mais detectado em todo o mundo. O genogrupo GIII é o que mais acomete suínos e, recentemente, os genogrupos GVI, GVII também foram relatados nesta população. Os dados sobre o genogrupo GV são limitados, porém, sabe-se que inclui suínos (GV.3) e leões marinhos (GV.4).

Os PoSaV tem sido isolados em diversos países do mundo como Estados Unidos, Japão, Korea do Sul, Venezuela, Brasil, Bélgica, Itália, China,

Dinamarca, Finlândia, Hungria, Eslovênia e Espanha, com prevalência muito variada. Nos suínos, a infecção por SaV pode ocorrer em todas as idades, especialmente em animais jovens, causando infecções e lesões no intestino delgado que levam à diarreia. A gastroenterite pode ser caracterizada por diarreia, ou ainda, vômito e diarreia (menos frequente). A infecção por PoSaV também pode ser subclínica.

Diversas amostras de SAV animal têm relação genética com amostras de SaV humanas sugerindo possível transmissão zoonótica. O SaV encontrado nos porcos domésticos e nos leões marinhos tem o genoma muito semelhante às variantes humanas do genogrupo GV, sugerindo uma possível transmissão inter-espécies (Bank-Wolf et al., 2010).

Tabela 3: Distribuição dos genogrupos de SaV animais.

| <b>Espécies</b> | <b>Genogrupo</b>            | <b>Referência</b>  |
|-----------------|-----------------------------|--------------------|
| Cachorro        | GXIII                       | Li et al., 2011a   |
| Suíno           | GIII, GV a GXI              | Guo et al., 1999   |
| Morcego         | GXIV (propostos: GXVI-GXIX) | Tse et al., 2012   |
| Vison           | GXII                        | Guo et al., 2001   |
| Chimpanzé       | GI                          | Mombo et al., 2014 |
| Leão marinho    | GV                          | Li et al., 2011b   |
| Rato            | GII, GXV                    | Firth et al., 2014 |

\*Tabela adaptada de Makhaola et al., 2020

### 1.11. Diagnóstico dos Sapovírus

Diversos métodos de diagnóstico de SaV humano tem sido utilizados desde a década de 1970. O diagnóstico pode ser direto por microscopia eletrônica de transmissão (MET), detecção de antígenos ou ácido nucléico. Atualmente, a MET não tem sido utilizada rotineiramente na maioria dos laboratórios, seja pela falta de profissionais capacitados para realizar este teste, seja por ser um método muito laborioso e que demanda excessivo tempo de execução.

Embora os antígenos sejam muito específicos, a alta diversidade genética do SaV dificulta os ensaios de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) tornando-os menos sensíveis que a detecção de ácido nucléico. Já a sorologia, permite o diagnóstico indireto, mas é clinicamente irrelevante, visto que a soroprevalência nos adultos é superior a 90% (Rousset et al., 2018).

A partir da década de 1990, o avanço de técnicas de biologia molecular, permitiu estabelecer os primeiros protocolos de detecção viral pela técnica de transcrição reversa - reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), que foi amplamente utilizado na detecção do SaV em população adulta e em crianças (Lee et al, 2012). Desde então, protocolos qualitativos e quantitativos têm sido utilizados como método de detecção e quantificação do SaV, como a PCR em Tempo Real (rRT-PCR). A vantagem da rRT-PCR em relação a RT-PCR convencional é a rapidez na execução, e, conseqüente, rapidez na liberação de resultados e, também a possibilidade de quantificação do cDNA, porém, ainda é considerado um método mais dispendioso. Até o momento, não há relatos do uso de rRT-PCR em larga escala para detecção de SaV no Brasil.

O uso de *primers* para diferentes alvos como a região da VP1, região da RdRp, ou para a junção da região VP1RdRp (as quais são as mais conservadas do genoma) tem sido amplamente utilizados (Trujillo et al., 2006). A VP1 é o alvo mais utilizado para RT-PCR pois, seu produto pode ser sequenciado para se obter a genotipagem (Oka et al., 2015). Devido à alta

diversidade genética, muitos ensaios incluem múltiplos *primers* ou *primers* degenerados (Oka et al., 2015).

O método diagnóstico padrão ouro para genotipagem e estudos de filogenia do SaV é o sequenciamento completo da VP1. Por apresentar aproximadamente 1600 pb, o sequenciamento desta região se torna bastante laborioso. Desta maneira, o sequenciamento parcial da região da VP1 tem sido muito utilizado pois, permite a identificação molecular e análise filogenética para caracterização dos diferentes SaV (Reuter et al., 2010). A definição de genogrupos e genótipos é muito importante para esclarecer a epidemiologia molecular dos SaV.

Atualmente os métodos mais utilizados para detecção dos SaV tem sido a RT-PCR *multiplex*, a RT-PCR convencional, a rRT-PCR e o sequenciamento de última geração (NGS) (Oka et al., 2015). Alguns SaV tem sido detectados por meio de técnicas como a metagenômica (que são independentes de *primer* específico) a partir de água de esgoto ou fezes de humanos, leões marinhos e cães. A metagenômica aplicada diretamente em amostras de fezes pode se tornar uma ferramenta de diagnóstico muito útil no futuro, quando seu custo e análise dos dados gerados for comparável aos métodos disponíveis. O sequenciamento do genoma completo ainda não faz parte das rotinas diagnósticas (Roussett et al., 2018).

Atualmente, um dos meios mais convenientes para obtenção de um RNA padrão que possa ser utilizado como controle positivo das reações moleculares e possibilitar estudos de quantificação do SaV é a clonagem molecular do fragmento de interesse em plasmídeo bacteriano de expressão. Além da grande quantidade de material genético que pode ser produzida com a transcrição *in vitro* da inserção, permitindo facilmente a dosagem por espectrofotometria, a identidade do fragmento pode ser verificada por reações de sequenciamento (Sambrook e Russell, 2001).

## 1.12. Epidemiologia

Globalmente, sabe-se que os SaV são importantes agentes etiológicos causadores de gastroenterite em crianças e adultos. Há diversos estudos epidemiológicos de SaV realizados na Ásia, Europa, Américas e África, em que este vírus é reconhecido como importante agente causador de gastroenterite aguda. No mundo, crianças com gastroenterite tem apresentado uma taxa de detecção de SaV que varia enormemente, entre 0,2 a 39% (Magwalivha et al, 2018) e entre 2,2 a 15,6% em indivíduos de todas as idades (Oka et al., 2015, Varela et al., 2019). No entanto, no Brasil sua incidência ainda é pouco estudada.

No Japão, 4% dos casos de gastroenterite viral nos anos de 2003 a 2009, foram causadas por SaV (Dey et al, 2012). Em Bangladesh, a taxa de detecção de SaV foi de 2,7% em crianças menores de 3 anos de idade, no período de 2004 a 2005 (Dey et al., 2007). Na Tailândia (Kumthip et al., 2020) foi relatada uma taxa de detecção de SaV que variou de 1,6% de 2010 a 2015 aumentando gradativamente até atingir 2,8% em 2018 em pacientes com até 11 anos de idade. Na China, alguns trabalhos relatam taxas de detecção de 0,5 a 1,89% em pacientes de todas as idades (Ren et al. 2013, Shen et al., 2016). No Vietnã, alguns trabalhos apresentam taxas de infecção por SaV muito baixas, de 0,8 a 1,2% em crianças estudadas no período de 2002 a 2003 e 2005 a 2006, respectivamente.

Nos anos de 2007 a 2009, os SaV foram responsáveis por 4% dos surtos de gastroenterite aguda que ocorreram em países da Europa como, Holanda, Suécia, Eslovênia, Hungria, etc. Estudo realizado na Dinamarca no período de 2005-2007 demonstrou a mais alta prevalência de SaV (9%) na faixa etária de 7-18 meses (Johnsen et al, 2009). Na Alemanha (Mann et al., 2019) detectou-se SaV em 8,8% das amostras coletadas de crianças entre os anos de 2008 e 2009 e, somente 2% de positividade em amostras coletadas de indivíduos de todas as idades no período de 2010 a 2018. Entre os anos de 2015 a 2016, a Itália apresentou uma taxa de detecção de 6% para SaV

em amostras de crianças com menos de 15 anos de idade (Biscaro et al., 2018).

Chhabra e colaboradores 2013, realizou estudo nos EUA nos anos de 2008-2009, em que 5,4% dos casos de diarreia aguda em crianças menores de 5 anos de idade foram causados por SaV. Já, no estudo de Becker-Dreps e colaboradores (2014), 16,6% dos enteropatógenos encontrados em crianças menores de 5 anos com diarreia na Nicarágua, foram ocasionados por SaV. Estudo de coorte realizado em crianças menores de 2 anos de idade no Peru detectou SaV em 11,5% das amostras (Sanchez et al., 2018). Nas Filipinas, Liu e colaboradores (2015) relataram alta taxa de detecção, 7% em crianças menores de 2 anos, no período de 2012 a 2013.

Estudo de revisão da distribuição dos SaV na África (Makhola et al., 2020) encontrou taxas de detecção que variaram de 0% na Nigéria a 19% em Angola. Essas diferenças na detecção foram observadas não só entre os países Africanos, mas entre estudos de diferentes regiões do mesmo país. Por exemplo, em estudo feito no Quênia foram relatadas taxas de detecção de 4% no distrito de Lwak e 6% no distrito de Kibera, enquanto que outro estudo conduzido no mesmo país apresentou taxas de 10,8% de indivíduos infectados por SaV. A maioria (89%) dos estudos africanos foi conduzido em crianças menores de 5 anos de idade e 68% destes, foram publicados entre 2015 e 2019.

No mundo, temos o genótipo de SaV GI.1 como o mais frequentemente encontrado, seguido do genótipo GI.2 (Svraka et al., 2010). Todavia, diferentes genótipos tem circulado pelo mundo ao longo dos anos e o estudo destas variações é de suma importância para entender a dinâmica dos SaV. A emergência de SaV geneticamente semelhantes em diversos países da Europa e as mudanças de genótipos e genogrupos ao longo dos anos no Japão tem sido relatadas (Svraka et al., 2010, Harada et al., 2012, Harada et al., 2009). Em 2007, o genótipo GIV.1 foi predominante no Japão, Canada, EUA e Europa. Estas mudanças dos genótipos predominantes de SaV demonstram uma característica única que os diferencia de outros CaV como

os NoV, que apresentam um genótipo específico predominante no mundo todo, GII.4.

Alguns trabalhos relatam coinfeções de SaV e outros vírus entéricos, como por exemplo, NoV, RVA, HAstrV, AdV, enterovírus (EV) (Iizuka et al., 2010, Iritani et al., 2014, Lyman et al., 2009, Rasanen et al., 2010).

### 1.13. Sapovírus no Brasil

Um dos primeiros estudos que detectou os CaVs humanos no Brasil foi realizado por Timenetsky e colaboradores (1993) em amostras de crianças sintomáticas e assintomáticas no período de 1987 a 1988 em São Paulo. Posteriormente, diversos trabalhos detectaram a presença dos NoVs na maioria dos estados brasileiros, chegando a ser o principal vírus causador de gastroenterite no Brasil atualmente.

As informações sobre a circulação dos SaV no Brasil são muito limitadas, pois estes vírus não estão incluídos no PMDDA. A maior parte do conhecimento adquirido sobre os SaV no Brasil provém de estudos realizados na região Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Os estudos são pontuais e realizados com um número reduzido de amostras. A Tabela 4 apresenta as características gerais dos principais estudos de SaV no Brasil até o momento.

Tabela 4: Características gerais dos estudos de identificação e caracterização molecular de sapovírus em amostras de fezes no Brasil.

| Cidade<br>/UF | Positivos                    |                 | Período de<br>Estudo | Genótipos            | Referência           |
|---------------|------------------------------|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|               | X<br>Nº Total de<br>Amostras | Faixa<br>Etária |                      |                      |                      |
| Salvador/BA   | 1/139<br>(0,7%)              | ≤ 3 anos        | 2001-2002            | GII.1                | Xavier et al., 2009  |
| Belém/PA      | 15/305<br>(4,9%)             | ≤ 3 anos        | 2003                 | GI.1, GI.2,<br>GII.1 | Aragão et al., 2010a |

|                                     |                   |                       |           |  |                             |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------------|-----------|--|-----------------------------|
| Belém/PA                            | 2/81<br>(2,5%)    | ≤ 10 anos             | 2008-2010 | GI.1, GI.2                                     | Aragão et al., 2013B        |
| Goiânia/GO                          | 25/539<br>(4,6%)  | ≤ 4 anos e<br>6 meses | 2009-2011 | GI.1, GI.3                                     | De Oliveira et al.,<br>2014 |
| São Luís/MA                         | 11/112<br>(9,8%)  | ≤ 3 anos              | 1997-1999 | GII.1  | Portal et al., 2016         |
| Rio de<br>Janeiro/RJ                | 12/341<br>(3,5%)  | ≤ 84 anos             | 2012-2014 | GI.1, GI.2,<br>GI.6, GII.1,<br>GV.1            | Fioretti et al., 2016       |
| Manaus/AM                           | 6/156<br>(3,8%)   | ≤10 anos              | 2010-2011 | GI.1, GI.2,<br>GII.2?, GII.4?,<br>GII.4, GII.2 | Reymão et al., 2016         |
| Belém/PA                            | 9/172<br>(5,2%)   | ≤ 2 anos              | 1990-1992 | GI.1, GI.7,<br>GII.1, GV.2                     | Costa et al., 2017          |
| Cajazeiras,<br>Patos, Sousa<br>(PB) | 35/1161<br>(3,0%) | 2 a 36<br>meses       | 2009-2012 | -  | Lima et al., 2019           |
| Crato (CE)                          |                   |                       |           |  |                             |
| Ouricuri (PE)                       |                   |                       |           |  |                             |
| Picos (PI)                          |                   |                       |           |  |                             |
| TO                                  | 8/8               | -                     | 2013-2016 | GI.2, GI.3                                     | Cilli et al., 2019          |

No estado do Pará, foi realizada a detecção de SaV (5,2%) em crianças menores de 2 anos de uma comunidade de baixa renda, no período de 1990 a 1992 (Costa et al., 2017). Os genótipos encontrados neste estudo foram GI.1, GI.7, GII.1 e GV.2. Aragão e colaboradores (2010) realizou estudo, no estado do Pará, com amostras de crianças menores de 3 anos coletadas no ano de 2003, com diagnóstico de diarreia. Das amostras testadas por RT-PCR, 4,92% foram positivas para SaV, sendo os genótipos GII.1, GI.1 e GI.2 os mais prevalentes. Em 2013, Aragão e colaboradores publicaram nova pesquisa, estudando crianças com menos de 10 anos de uma Comunidade Quilombola localizada em Belém, Pará no período de 2008 a 2010. A taxa de

detecção de SaV nessa população carente, com pouca infraestrutura, contato íntimo com animais e falta de água potável foi de 2,5% (taxa mais baixa do que a detectada anteriormente neste estado, porém mais alta que a detectada na Bahia, 0,7%) e os genótipos encontrados foram os mais comumente relatados, GI.1 e GII.2. Na Bahia, estudo com 139 amostras de fezes de crianças menores de 3 anos com gastroenterite aguda também identificou a presença de um SaV do genótipo GII.1 (Xavier et al., 2009).

No estado de Goiânia, foi realizado o monitoramento de crianças frequentadoras de uma creche, entre os anos de 2009 a 2011, sendo observada excreção assintomática e prolongada de SaV; os genótipos GI.1 e GI.3 foram encontrados em 4,6% das amostras positivas (De Oliveira et al. 2014). Lima e colaboradores (2019) conduziram estudo de caso controle em 6 cidades da região semiárida do Brasil: Cajazeiras (PB), Patos (PB), Sousa (PB), Crato (CE), Ouricuri (PE) e Picos (PI). De 1161 amostras de crianças menores de 36 meses, somente 35 (3%) testaram positivas para SaV. No Rio de Janeiro, Fioretti e colaboradores (2016) também encontraram taxa de detecção de 3,5% de SaV em amostras de fezes de pacientes no período de 2012 a 2014. As análises filogenéticas deste estudo revelaram a circulação de 5 genótipos: GI.1, GI.2, GI.6, GII.1 e GV.1.

Portal e colaboradores (2016) realizaram estudo em crianças menores de 3 anos de idade hospitalizadas, com e sem diarreia, no estado do Maranhão. A frequência de SaV encontrada foi de 9,8% e somente uma amostra foi sequenciada, apresentando o genótipo GII.1. Em Manaus, amostras de fezes de crianças hospitalizadas menores de 10 anos de idade apresentando diarreia foram testadas contra SaV, detectando-se 3,8% de positividade. Diversos genótipos foram relatados: GI.1, GI.2, GII.2 e GII.4 (Reymão et al., 2016).

Em 2019, Cilli e colaboradores relataram a detecção de 6 SaV do genótipo GI.2 e 2 amostras do genótipo GI.3 em amostras coletadas no estado de Tocantins no período de 2013 a 2016.

*RELEVÂNCIA*

## 2. RELEVÂNCIA

Após a introdução da vacina contra RVA no Programa Nacional de Imunização (PNI) do Brasil em março de 2006, os casos de gastroenterite por RVA diminuíram drasticamente e o NoV emergiu como a principal causa de diarreia aguda em crianças em todo o mundo. Além dos NoV, outros vírus como o SaV, AdV e HAstrV passaram a ser detectados de forma frequente em pacientes com gastroenterite (Payne et al., 2008).

Atualmente, os SaV são considerados importantes agentes causadores de gastroenterite em humanos. A diversidade genética destes vírus tem sido estudada em diversos países e a necessidade de vigilância é citada por diferentes autores (Becker-Dreps et al, 2014; Chhabra et al, 2013). Contudo, no Brasil, há poucos estudos sobre a incidência/detecção e, principalmente, sobre a diversidade genética dos SaV. Até o presente momento, nenhum estudo de prevalência de SaV no estado de São Paulo foi realizado. A maioria dos estudos brasileiros tem sido realizados com um número limitado de amostras e não contemplam indivíduos de todas as idades (Aragão et al., 2010, Xavier et al., 2009, De Oliveira et al. 2014).

A implantação das técnicas moleculares de diagnóstico de SaV no IAL possibilita a realização de estudos que direcionarão a vigilância epidemiológica. A determinação dos genótipos circulantes e estudos filogenéticos das sequências encontradas dos SaV servem para monitorar a diversidade destes vírus e estabelecer as relações filogenéticas entre os vírus encontrados no Brasil e os detectados em outros países.

Portanto, o objetivo desta tese foi padronizar e implantar testes para diagnóstico dos SaV em amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda no Brasil. Este estudo contribui para o esclarecimento de cerca de 40% dos casos de gastroenterite aguda em que não há definição do agente causador da doença.

*OBJETIVO*

### **3. OBJETIVO**

O estudo teve por objetivo geral a padronização e implantação de técnicas moleculares e a caracterização molecular de SaV em amostras de fezes de pacientes com gastroenterite.

#### **3.1. Objetivos Específicos**

- 1- Padronizar o ensaio de RT-PCR convencional para diagnóstico dos SaV.
- 2- Padronizar o ensaio de rRT-PCR para diagnóstico dos SaV.
- 3- Obter o RNA padrão para SaV por clonagem.
- 4- Determinar os genótipos circulantes nas regiões Centro Oeste, Sudeste e Sul, pelo sequenciamento dos SaV detectados.
- 5- Analisar filogeneticamente os SaV.
- 6- Estudar os SaV em surtos e casos esporádicos em crianças e adultos.
- 7- Estudar a taxa de detecção e frequência de SaV por faixa etária.
- 8- Implantar o diagnóstico dos SaV no monitoramento laboratorial das gastroenterites no Núcleo de Doenças Entéricas do Instituto Adolfo Lutz (NDE-IAL).

## *MATERIAL E MÉTODOS*

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. MATERIAIS**

#### **4.1.1. Amostragem**

O presente estudo, retrospectivo e descritivo foi realizado utilizando amostras fecais de conveniência, coletadas de pacientes de 0 a 91 anos, provenientes das regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil. Estas amostras foram coletadas por meio do PMDDA e fazem parte do biorrepositório do Núcleo de Doenças Entéricas do Instituto Adolfo Lutz (NDE-IAL), Centro de Referência Macrorregional para a vigilância das gastroenterites virais, Ministério da Saúde (MS) – Brasil (Figura 5). O PMDDA estuda amostras fecais de pacientes com sintomas de gastroenterite aguda que são enviadas ao NDE-IAL e permanecem estocadas em freezer -20°C até o momento das análises. As amostras foram testadas para RVA por kits de ELISA comerciais. Amostras negativas para RVA também foram analisadas para NoV por kits de ELISA comerciais e rRT-PCR *in house*, e para AdV utilizando a PCR convencional.

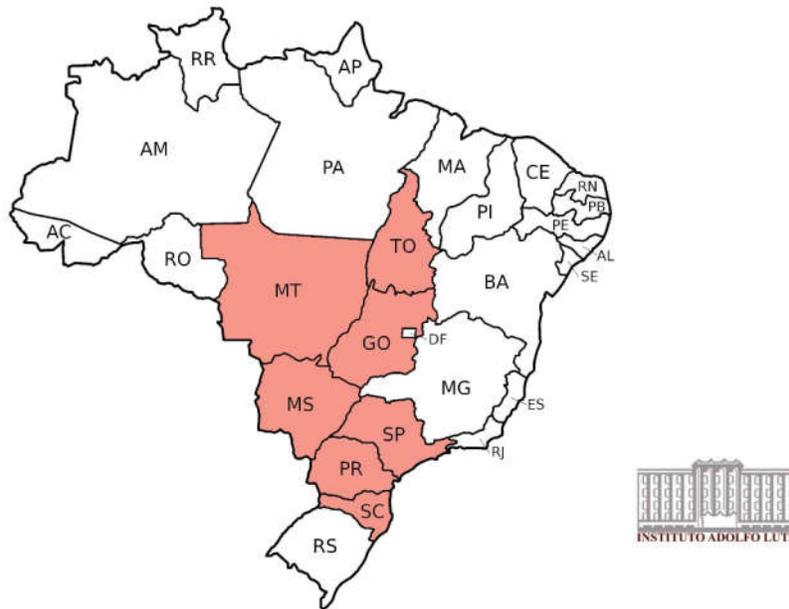


Figura 5: Mapa do Brasil: em destaque estão os Estados de Mato Grosso (MT), Tocantins (TO), Goiás (GO), Mato Grosso do Sul (MS), São Paulo (SP), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e o Distrito Federal (DF) das regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil que fazem parte do PMDDA e têm o NDE-IAL como centro de referência macrorregional para a vigilância das gastroenterites virais.

O estudo dos SaV foi realizado como diagnóstico diferencial para surtos e casos esporádicos de diarreia aguda com suspeita de infecção viral que não tenham sido confirmados como RVA, NoV ou AdV, seguindo o algoritmo interno do NDE.

Entre 2010 e 2017, 8524 amostras foram encaminhadas ao NDE com suspeita de gastroenterite viral. Para este estudo foram selecionadas amostras negativas para RVA, NoV e AdV, num total de 3974 (46,6%) amostras contendo informações básicas para estudos como idade do paciente, data de início dos sintomas e data de coleta da amostra. As faixas etárias estudadas foram assim divididas: 0-2 anos, 3-5 anos, 6-18 anos, 19-60 anos e >60 anos.

#### 4.1.2. Controle positivo

Como controle positivo (CP) para SaV foi utilizada uma amostra de fezes sabidamente positiva cedida pela Dra. Yvone B. Gabbay, do Instituto Evandro Chagas, Pará, Brasil. Para o início dos testes, o RNA viral contido nessa amostra foi extraído e confirmado por RT-PCR convencional para o gene VP1 como SaV. Após o sequenciamento, a amostra foi classificada como SaV GI.1.

#### 4.1.3. Suspensão Fecal

As amostras fecais armazenadas em freezer -20°C foram clarificadas por suspensão a 10% em 1mL do tampão Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA), HCl (Merck & Co., Inc, Whitehouse Station, NJ), respectivamente (Tris/HCl 10mM; pH 7,4). Essas suspensões foram agitadas vigorosamente por 3 minutos e centrifugadas a 5000 x g por 30 minutos, adaptado de Pereira e colaboradores (1983). O sobrenadante das suspensões fecais foram então, estocados em freezer a -20°C. Devido ao grande número de amostras utilizado no presente estudo, estas foram testadas em *pool*. Cada *pool* foi constituído por 5 amostras de fezes, seguindo a ordem numérica crescente das amostras dos anos em estudo. Os *pools* foram preparados utilizando a técnica de clarificação de amostras com a inclusão de 10% de cada uma das 5 alíquotas de fezes no mesmo tubo contendo 1mL do tampão Tris. Assim que a positividade foi constatada em determinado *pool*, essas amostras integrantes do *pool* foram testadas individualmente (a partir da alíquota armazenada) de modo a se identificar o caso ou os casos positivos.

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando o kit *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Neste kit utilizam-se colunas de centrifugação compostas por sílica-gel para aumentar as chances de extração e concentração de pequenas quantidades de ácido nucléico. Esta metodologia foi utilizada para extração do RNA das amostras de fezes mantidas em freezer -20°C até o momento da extração. Para isso, 140 µL das suspensões fecais foram adicionadas a 560 µL do tampão AVL contendo o *RNA Carrier* e estes microtubos, agitados vigorosamente. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas rapidamente. Em seguida, 560 µL de etanol 100% foram adicionados e novamente, as amostras foram agitadas vigorosamente e centrifugadas. À coluna de sílica foram adicionados 630 µL da mistura e, esta, centrifugada a 6000 x g por 1 minuto para ligação do RNA ao filtro. O coletor contendo o filtrado foi descartado e substituído por outro. Este procedimento foi repetido mais uma vez ou até que toda a mistura tenha atravessado a coluna. Foram adicionados 500 µL do tampão AW1 na coluna para lavagem do RNA e esta foi centrifugada a 6000 x g por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado e substituído; 500 µL do tampão AW2 foram adicionados à coluna e centrifugados a 20000 x g por 3 minutos. O coletor contendo o filtrado foi descartado, substituído e nova centrifugação foi realizada a 20000 x g por 1 minuto. Finalmente, foram adicionados 60 µL de tampão AVE à coluna, incubada 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugada a 6000 x g por 1 minuto. O filtrado contendo o RNA foi armazenado em freezer -20°C até o momento do uso.

#### 4.2.2. Padronização da RT-PCR convencional

Para a escolha do tipo de RT-PCR convencional que seria utilizada neste estudo foram testadas duas metodologias: a RT-PCR (single-round) e a *nested* RT-PCR constantes no Quadro 1 e utilizando diferentes *primers* (Tabela 5), que amplificam parte da região da proteína VP1. Para realizar estes testes comparativos, foram usados o CP e 69 *pools* de amostras aleatórias pertencentes ao ano de 2012. Os *primers* que se mostraram mais sensíveis na detecção dos SaV foram eleitos para a realização do *screening* de todas as amostras deste estudo.

Quadro 1. Combinação dos *primers* testados para a detecção molecular das amostras de sapovírus por RT-PCR convencional.

| <b>RT-PCR (<i>Single-round</i>)</b>    |  | <b>Referência</b>   |
|--|--|---|
| SV-F11 / SV-R1                         |  | Kitajima et al (2010), Choi et al (2015), Yoneda et al (2016) |
| <b><i>Nested</i>-RT-PCR</b>            |  |   |
| <b>RT-PCR<br/>(<i>First-Round</i>)</b> | <b><i>Nested</i> PCR<br/>(<i>Second-round</i>)</b> |   |
| SV-F11 / SV-R1                         | SV-F21 / R2  | Okada et al (2002), Hasnman et al (2005)                      |
| SV-F13 / SV-R13<br>SV-F14 / SV-R14     | SV-F22 / R2  | Okada et al (2006), Kitajima et al (2010)                     |

Tabela 5. Sequência dos *primers* testados para a detecção molecular do sapovírus por RT-PCR convencional.

| Primer | Orientação | Posição*  | Sequência 5' - 3'       |
|--------|------------|-----------|-------------------------|
| SV-F11 | +          | 5098-5117 | GCYTGGTTYATAGGTGGTAC    |
| SV-R1  | -          | 5878-5857 | CWGGTGAMACMCCATTKTTCCAT |
| SV-F21 | +          | 5157-5177 | ANTAGTGTTTGARATGGAGGG   |
| SV-F22 | +          | 5154-5172 | SMWAWTAGTGTTTGARATG     |
| SV-R2  | -          | 5591-5572 | GWGGGRTCAACMCCWGGTGG    |
| SV-F13 | +          | 5074-5094 | GAYYWGGCYCTCGCYACCTAC   |
| SV-F14 | +          | 5074-5094 | GAACAAGCTGTGGCATGCTAC   |
| SV-R13 | -          | 5876-5861 | GGTGANAYNCCATTKTCCAT    |
| SV-R14 | -          | 5876-5861 | GGTGAGMMYCCATTCTCCAT    |

\*Posição da sequência dos nucleotídeos baseada no vírus Manchester (número de acesso: X86560)

Segue a mistura de bases degeneradas para os *primers* e *probes*: Y=C/T, S=G/C, R=A/G, W=A/T, M=A/C, K=G/T

Dois kits comerciais para ambas as metodologias de RT-PCR convencional (*Single-round*) e *nested* RT-PCR (*First-round*) foram testados: *SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System* (Promega, EUA) que consistem em um tampão específico para a reação contendo dNTPs e MgSO<sub>4</sub> ou MgCl (Master Mix) e as enzimas (transcriptase reversa e polimerase).

Para a PCR convencional foi utilizada uma mistura para 20 µL de volume final contendo: 12,5 µL Master Mix, 0,5 µL enzima, 0,5 µL de cada um dos *primers* escolhidos para os testes na concentração de 10 µM (Tabela 5) e água para biologia molecular em quantidade suficiente para 20 µL; e por fim, adicionou-se 10 µL do RNA extraído das amostras.

A *nested* RT-PCR foi realizada utilizando-se da mistura de reagentes como descrita acima adicionando-se 2 µL do produto da primeira PCR. As condições para amplificação do produto da RT-PCR foram: transcrição

reversa a 50°C por 30 segundos, seguido da desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento 48°C por 30 segundos, reação de extensão a 74°C por 45 segundos, e extensão final a 74°C por 5 minutos. A *nested* PCR teve como condições de amplificação: desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 48°C por 30 segundos, reação de extensão a 74°C por 45 segundos, e extensão final a 74°C por 5 minutos (Okada et al, 2006).

Em todas as reações de PCR foram acrescentados o CP e Controle Negativo (CN) (água para biologia molecular). A PCR foi realizada em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystem).

#### **4.2.3. Fotodocumentação em gel de agarose**

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1,2% (Invitrogen, Carlsbad, CA) diluída em tampão TBE 1x (Tris-ácido bórico-EDTA; pH 8,0). Adicionou-se 6µL de *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Inc., CA, EUA) (Sambrook et al., 1989), corante fluorescente intercalante de DNA. O gel foi preparado em cuba de eletroforese horizontal e as cavidades (poços) para aplicação dos *amplicons* foram formadas com pentes. Após a solidificação do gel, a corrida eletroforética ocorreu utilizando-se uma cuba horizontal contendo tampão de corrida TBE 1x. O volume de 7µL do produto amplificado foi misturado à 3µL de tampão de aplicação (azul de bromofenol 1% acrescido de sacarose) e aplicado às cavidades correspondentes. O volume de 4 µL do marcador de peso molecular (100pb *DNA Ladder*, Invitrogen, Carlsbad, CA) também foi aplicado acrescido de 3µL de tampão de aplicação. O sistema de corrida foi submetido a uma corrente elétrica constante de 120V por 50 minutos.

Os *amplicons* foram observados em transiluminador *L-Pix Touch* (Loccus Biotecnologia) e o registro do resultado foi feito por meio de fotos dos

géis. Todas as amostras consideradas positivas, apresentaram bandas de tamanhos específicos para cada par de *primers* utilizados.

Os fragmentos esperados quando da utilização dos *primers* SV-F11, SV-R1 foram de aproximadamente 780pb, para os *primers* SV-F13/F14, SV-R13/R14, 800pb e para a *nested*-PCR com os *primers* SV-F22/SV-R2 ou SV-F21/SV-R2, um fragmento de aproximadamente 420pb do gene do capsídeo foi amplificado (Nakamura et al., 2010 e Kitajima et al., 2010).

#### **4.2.4. Screening das amostras com suspeita de gastroenterite**

As 3974 amostras negativas para RVA, NoV e AdV recebidas no NDE nos anos de 2010 a 2017 foram analisadas em *pools* para SaV por *nested* RT-PCR utilizando os *primers* SV-F11 / SV-R1 e SV-F21 / R2 e nas condições descritas anteriormente, utilizando-se o kit *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System* (Promega, EUA).

#### **4.2.5. Padronização da rRT-PCR**

A rRT-PCR foi padronizada utilizando como alvo a região mais conservada do genoma dos SaV, a junção capsídeo-polimerase localizada na ORF1 de todos os SaV humanos (GI, GII, GIV e GV), em reação única, de acordo com Oka e colaboradores (2006) com modificações. Este protocolo tem sido amplamente utilizado em literaturas do Brasil e do mundo (Diez-Valcarce et al., 2018, Sánchez et al, 2018; Fioretti et al, 2016; Shioda et al., 2016, Torner et al., 2016, Liu et al, 2015; Niwa et al, 2014; Chhabra et al, 2013, Kitajima et al, 2010, Johnsen et al., 2009).

Os testes de padronização foram realizados utilizando-se a plataforma *ABI 7500 Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) e a plataforma *LightCycler 480®* (Roche, Alemanha). Os kits usados foram: *SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad, CA,

EUA) e *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System* (Promega, EUA) que consistem em um tampão específico para a reação (Master Mix), enzima e referência passiva ROX/CXR.

A reação de rRT-PCR foi testada usando ambos os kits para rRT-PCR citados acima (Invitrogen e Promega). Foi realizada uma mistura de volume final 25 µL contendo: 12,5 µL Master Mix, 0,5 µL enzima, 0,5 µL de cada um dos *primers* a 400nM (SaV124F, SaV1F, SaV5F e SaV1245R), 1 µL de cada *probe TaqMan®* com MGB (minor groove-binding) a 5 pmol (SaV124TP e SaV5TP) (Tabela 6), água grau puro para biologia molecular em quantidade suficiente para 20 µL, e por fim, 5 µL do RNA extraído das amostras. O CP e CN (água livre de DNase e RNase) foram incluídos em cada reação. As condições de ciclagem foram: 1 ciclo a 50°C por 30 minutos (para transcrição reversa) e, então, 95°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 56°C por 1 minuto.

Quando necessário, 0,03 µL da referência passiva ROX/CXR foi incluída para normalizar o sinal da fluorescência do repórter.

A *probe* do tipo *TaqMan®* foi marcada na região 5´terminal com molécula sinalizadora 6-carboxifluoresceína (FAM) e na região 3´ terminal com MGB. O MGB aumenta a temperatura de *melting* ( $T_m$ ) das sondas, permitindo o uso de sondas pequenas.

As etapas da rRT-PCR foram realizadas em diferentes salas: a etapa de extração do RNA viral foi realizado em cabine de segurança biológica em área isolada; a mistura dos reagentes e preparo das microplacas foi feita em estação de trabalho (*workstation*) na área 1, e as amostras de RNA viral foram aplicadas na microplaca na área 2. Para controle de reagentes e ambiente, foram inseridos 2 NTC (no template control) em todas as reações.

Tabela 6. *Primers e probes* utilizados na rRT-PCR para sapovírus. Tabela extraída de Oka e colaboradores, 2006.

|               | <i>Primer</i> ou<br><i>Probe</i> | Sequence (5' - 3') <sup>a</sup>          | Polaridade<br><sup>b</sup> | Localização            |
|---------------|----------------------------------|--|----------------------------|------------------------|
| <i>Primer</i> | SaV124F                          | GAY CAS GCT CTC GCY ACC TAC              | +                          | 5078-5098 <sup>d</sup> |
|               | SaV 1F                           | TTG GCC CTC GCC ACC TAC                  | +                          | 5077-5094 <sup>e</sup> |
|               | SaV5F                            | TTT GAA CAA GCT GTG GCA TGC<br>TAC       | +                          | 5112-5135 <sup>f</sup> |
|               | SaV1245R                         | CCC TCC ATY TCA AAC ACT A                | -                          | 5163-5181 <sup>d</sup> |
| <i>Probe</i>  | SaV124TP                         | FAM - CCR CCT ATR AAC CA -<br>MGB-NQF    | -                          | 5105-5118 <sup>d</sup> |
|               | SaV5TP                           | FAM - TGC CAC CAA TGT ACC A -<br>MGB-NQF | -                          | 5142-5157 <sup>f</sup> |

- Segue a mistura de bases degeneradas para os *primers* e *probes*: Y=C/T, S=G/C, R=A/G
- + senso, - anti-senso
- As *probes* são marcadas com molécula sinalizadora (*reporter dye*) 6-carboxifluoresceína (FAM) na região 5' terminal e com MGB (*minor groove-binding*) *quencher* não fluorescente (NQF) na região 3' terminal do oligonucleotídeo
- Corresponde a posição de nucleotídeos da amostra Mc10 GII do genoma completo (AY237420)
- Corresponde a posição de nucleotídeos da amostra Parkville GI da sequência parcial (U73124)
- Corresponde a posição de nucleotídeos da amostra NK24 GV do genoma completo (AY646856)

Para a visualização dos resultados e análises dos parâmetros das reações, como *Threshold Cycle* (Ct) e  $\Delta Rn$  foi utilizado o *software* do equipamento fornecido pelo fabricante.

Após a padronização do teste, somente o kit *SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR* foi utilizado para realizar a rRT-PCR das amostras selecionadas.

#### 4.2.6. Validação do ensaio de rRT-PCR

Para validação analítica do ensaio de rRT-PCR foi utilizado como padrão o CP, amostras positivas para SaV e amostras positivas para outros vírus que causam gastroenterite. Estas amostras foram analisadas por RT-PCR convencional e, posteriormente, sequenciadas para verificação dos genótipos.

Para avaliar a eficiência do protocolo de rRT-PCR, uma curva de diluição em série de 5 (5 logs) foi processada para detecção da região da junção polimerase/capsídeo da ORF1 dos SaV. O teste de linearidade foi realizado por curva em quadruplicata, composta por 6 pontos de concentração, iniciando na amostra diluída 1:10, seguida por 5 diluições de 1:5, utilizando-se a plataforma *ABI 7500 Real Time PCR System*.

A maior diluição que produziu sinal de amplificação foi 1:5<sup>5</sup>. Para o cálculo dos parâmetros de eficiência, foi considerado o valor estimado de 1 cópia na diluição 1:5<sup>5</sup>, correspondendo ao ponto de maior diluição da curva que produziu sinal de amplificação. Para os cálculos de eficiência foram excluídos os pontos cuja diluição não produziu sinal de amplificação.

Para avaliação da especificidade e sensibilidade diagnóstica da rRT-PCR em relação à detecção de SaV foram selecionadas amostras provenientes do monitoramento das diarreias agudas e previamente caracterizadas por metodologias moleculares (PCR convencional e sequenciamento). Para compor o grupo dos “verdadeiros negativos” foram selecionadas duas amostras positivas para cada um dos vírus que mais comumente são encontrados em amostras com suspeita de diarreia viral e para os quais o NDE realiza o diagnóstico diferencial nos casos de gastroenterite: RVA, NoV, AdV e HAstrV. O grupo dos “verdadeiros positivos” foi composto por 15 amostras positivas para SaV e que já haviam sido testadas e tiveram resultado negativo para os outros vírus citados acima.

Para o teste de repetibilidade, foram realizados 4 ensaios em 3 dias consecutivos, com as amostras sendo analisadas em triplicata. A reprodutibilidade intralaboratorial foi analisada testando as mesmas amostras

em triplicata por 2 técnicos diferentes e outro ensaio usando 2 equipamentos diferentes.

#### **4.2.7. Análise estatística**

Para análise estatística relativa à eficiência do protocolo de rRT-PCR, linearidade, inclinação da curva (*Slope*), coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e desvio padrão foram utilizados os softwares dos equipamentos ABI 7500 Real Time PCR System e LightCycler 480®.

#### **4.2.8. Avaliação da *nested* RT-PCR em relação a rRT-PCR**

Para avaliar a sensibilidade e especificidade da *nested* RT-PCR em relação a rRT-PCR para a detecção de SaV foi selecionado um grupo de 202 amostras de fezes de crianças menores de 5 anos de idade provenientes das regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul, coletadas no ano de 2017.

#### **4.2.9. Sequenciamento e Análise**

##### **4.2.9.1. Purificação do produto da PCR**

O produto da PCR foi submetido à purificação pelo kit comercial *PureLink™ PCR Purification kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Foram adicionados 400µL do tampão de ligação acrescido de isopropanol a cada produto da PCR, seguindo-se de homogeneização em agitador de tubos. As misturas foram transferidas para as colunas de purificação e centrifugadas a 10000 x g por 1 minuto. Os filtrados coletados nos tubos coletores foram desprezados e os microtubos contendo a coluna de purificação foram transferidos para um novo tubo coletor. Adicionaram-se 650 µL de tampão de lavagem acrescido de etanol a cada

coluna, seguindo-se de centrifugação a 10000 x g por 1 minuto. Novamente, os tubos coletores foram descartados e os microtubos contendo a coluna foram transferidos para o novo tubo coletor. Uma nova centrifugação a 13000 x g foi realizada por 2 a 3 minutos para remover qualquer resíduo do tampão de lavagem. Os microtubos contendo a coluna de purificação foram transferidos para o tubo de eluição e 50µL do tampão de eluição (10mM Tris/HCL, pH 8,5) foi adicionado ao centro da coluna. As misturas foram incubadas por 1 minuto à temperatura ambiente, seguindo-se de centrifugação a 13000 x g por 2 minutos. Os microtubos contendo a coluna de purificação foram removidos e descartados. Todas as etapas da reação foram realizadas em temperatura ambiente (20-25°C). Após a purificação, a solução de DNA obtida foi estocada a -20°C até o momento da reação de sequenciamento.

#### **4.2.9.2. Quantificação do produto da PCR após a purificação**

Após a purificação do produto da PCR, foi determinada a concentração do DNA resultante por meio de eletroforese em gel de agarose utilizando-se um padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA) para comparação visual da intensidade da banda adquirida. Dessa forma, foi possível definir a concentração de DNA de cada amostra a ser usado na reação de sequenciamento.

#### **4.2.9.3. Reação de sequenciamento**

O Kit *Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Inc., EUA) foi utilizado para a reação de sequenciamento das amostras, seguindo o método de Sanger e colaboradores (1977).

A mistura para sequenciamento contém: 2µL de *BigDye®* (Applied Biosystems, Inc., EUA), 6µL de tampão 5x concentrado (Invitrogen, Carlsbad,

CA), 1µL de cada *primer* específicos SV-F21 (*primer* senso) e SV-R2 (*primer* anti-senso) e água MilliQ estéril para completar o volume final de 25 µL. Todas as etapas do preparo da mistura foram realizadas em banho de gelo. A ciclagem foi realizada em termociclador com a seguinte programação: 25 ciclos (96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 64°C por 4 minutos).

#### 4.2.9.4. **Purificação e precipitação do produto da reação de sequenciamento**

Os produtos de sequenciamento foram purificados utilizando o método acetato-etanol quando a reação de sequenciamento foi realizada em placa de 96 orifícios ou purificado em colunas de centrifugação *Centri-Sep™ spin columns* (Invitrogen, Carlsbad, CA) quando da utilização de microtubos, este último, realizado de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

#### 4.2.9.5. **Método de purificação Acetato-Etanol**

A purificação iniciou-se com a adição de 52 µL da solução etanol/acetato de sódio em cada orifício da placa em que o sequenciamento foi realizado, misturando bem com o auxílio da micropipeta multicanal. A placa foi vedada e colocada em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, a placa foi centrifugada a 2000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a placa invertida em papel absorvente. Outra centrifugação foi realizada 150 x g por 1 minuto (sem vedação).

Adicionou-se 150µL de etanol a 70% em cada orifício da placa e esta foi centrifugada a 2000 X g por 5 minutos. Novamente, o sobrenadante foi desprezado, a placa invertida em papel absorvente e a 150 x g por 1 minuto (sem vedação). A placa com selante foi armazenada a -20°C até o momento do sequenciamento.

#### **4.2.9.6. Método de purificação por colunas de centrifugação**

As colunas de purificação Centri-Sep™ Spin Columns (ThermoFisher) foram previamente hidratadas com 800µL de água milliQ estéril por 30 minutos. Após a hidratação, as colunas foram acopladas a tubos coletores e centrifugadas a 750 x g por 2 minutos. Os tubos coletores foram removidos e as colunas foram transferidas para novos microtubos. Adicionaram-se 20µL do produto de cada *cycle sequencing* nos microtubos contendo a coluna de purificação, seguindo-se de centrifugação a 750 x g por 2 minutos. O filtrado contendo o produto de sequenciamento foi seco por centrifugação em centrífuga à vácuo utilizando a temperatura de 45°C por 2 horas. O produto precipitado foi armazenado em freezer -20°C até o momento do sequenciamento.

Na etapa final os produtos precipitados foram ressuspensos em 10µL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, Inc., EUA) e submetidos à análise em sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems, Inc. USA), utilizando o polímero POP7 (Applied Biosystems, Inc., EUA).

#### **4.2.9.7. Análise das sequências de nucleotídeos**

Os cromatogramas das sequências senso e anti-senso obtidos pela análise do sequenciador automático foram editados manualmente a fim de se obterem sequências consenso (*contigs*), usando o software *Sequencher*™ 4.7 (Gene Codes Corporation, Michigan, EUA). O site *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) foi utilizado como ferramenta para a comparação das sequências consenso geradas para cada amostra.

As sequências obtidas neste estudo e um conjunto de sequências cognatas disponíveis na base de dados *GenBank*, foram alinhadas utilizando o programa *Clustal W* (Thompson et al 1994). O programa

*BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA) foi usado para a análise das sequências alinhadas e cálculo das matrizes de identidade.

As árvores de nucleotídeos utilizaram como critério de algoritmo de distância *Neighbor Joining* (NJ) determinado pelo programa MEGA versão 6.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura et al., 2007). O valor de *bootstrap* foi calculado com 1000 repetições.

#### **4.2.9.8. Números de acesso das sequencias no *GenBank***

As sequências parciais de nucleotídeos dos SaV foram depositadas no *GenBank* sob os seguintes números de acesso: MT939669-MT939694, MW149517-MW149520, MW160211-MW160214, MW175902-MW175920, MW183114-MW183120, MW191836-MW191848, MW206713-MW206736.

#### **4.2.9.9. Clonagem de Sapovírus**

Para a obtenção de um RNA padrão que possa ser utilizado como CP, foi realizada a clonagem molecular da região VP1 do genoma viral de uma amostra já sequenciada de SaV genótipo GI.1.

Após a purificação em gel de agarose 1,2%, o produto de PCR foi ligado ao vetor pGEM-T Easy (Promega) do kit *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I* (Promega) (Figura 6), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida transformado em *E. coli* competente. Um volume de 200 µl do transformante foi adicionado em placa de petri contendo 20 mL de meio LB Agar com ampicilina (100 µg/mL), IPTG (100 ng/mL) e X-gal (50 ng/mL). Após 24h na estufa a 37°C as colônias brancas foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (250 mg/mL) por 16h em agitação de 240 rpm a 37°C. Para extrair o DNA plasmidial da cultura bacteriana foi realizada a lise alcalina com SDS (Sambrook & Russell, 2001). Para linearização dos

plasmídeos foi realizada uma digestão com a enzima PST1 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

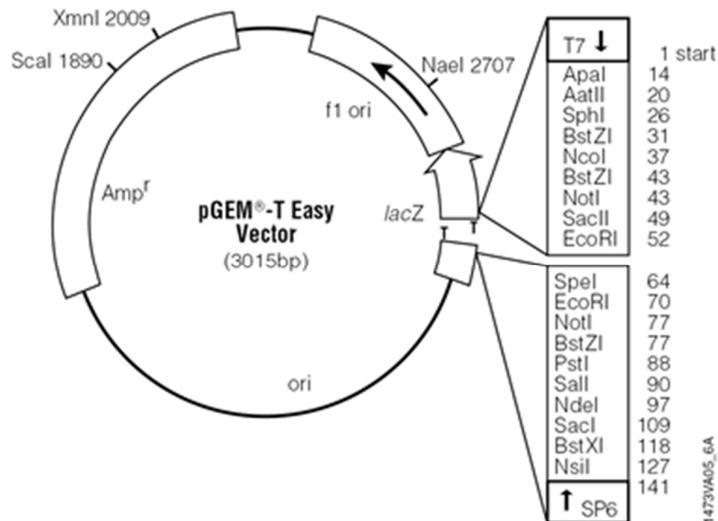


Figura 6: Representação do vetor pGEM-T Easy (Promega) do kit *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I* (Promega). Fonte: site <https://www.promega.com.br/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>

O plasmídeo linearizado foi transcrito *in vitro*, sob a ação da enzima T7, com o emprego do kit MEGAscript T7 (Invitrogen). O RNA transcrito foi tratado com a enzima DNase I, seguido de inativação da enzima pelo reagente inativador de DNase, para eliminar resíduos de DNA da fita molde, e purificado pelo método de coluna, segundo kit *MEGAclean<sup>™</sup> transcription clean-up* kit (Invitrogen) eluído em volume final de 100 µl. Para quantificar o RNA transcrito foi utilizado o kit *Quanti-iT<sup>™</sup> RiboGreen<sup>™</sup> RNA Assay* (Invitrogen).

O RNA sintético foi diluído seriadamente e a rRT-PCR foi realizada para quantificação e escolha da melhor diluição de uso. Este RNA foi aliquotado e estocado a -80°C.

## *RESULTADOS*

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Padronização da RT-PCR convencional

Para a realização da RT-PCR convencional foram testados 2 kits comerciais que funcionaram de forma satisfatória em todos os testes utilizando o CP. Portanto, para a padronização dos testes de RT-PCR convencional foi escolhido como padrão o kit *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System*.

Na comparação dos testes de PCR convencional com diferentes *primers*, o ensaio de *nested* RT-PCR com *primers* SV-F11 / SV-R1 e F21 / R2 foi o que obteve melhores resultados para detecção dos SaV (18/69) (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação de testes de PCR convencional utilizando diferentes *primers* para detecção de SaV.

| PCR convencional                   | <i>Primers</i>                                      | Positividade para SaV |
|------------------------------------|---|-----------------------|
| <b>RT-PCR: <i>Single-round</i></b> | SV-F11 / SV-R1                                      | 8/69                  |
| <b><i>Nested</i>-RT-PCR</b>        | SV-F11 / SV-R1<br>e SV-F21 / R2                     | 18/69                 |
| <b><i>Nested</i>-RT-PCR</b>        | SV-F13 / SV-R13<br>SV-F14 / SV-R14<br>e SV-F22 / R2 | 13/69                 |

## 5.2. *Screening* das amostras com suspeita de gastroenterite

Após estabelecer os parâmetros para o ensaio de *nested* RT-PCR, todos os *pools* contendo as 3974 amostras negativas para RVA, NoV e AdV armazenadas no NDE dos anos de 2010 a 2017 foram analisadas para SaV. Dessas 3974, 149 (3,7%) foram positivas para SaV utilizando a *nested* RT-PCR. Abaixo segue foto de gel de agarose contendo 7 das 149 amostras positivas para SaV (Figura 7).

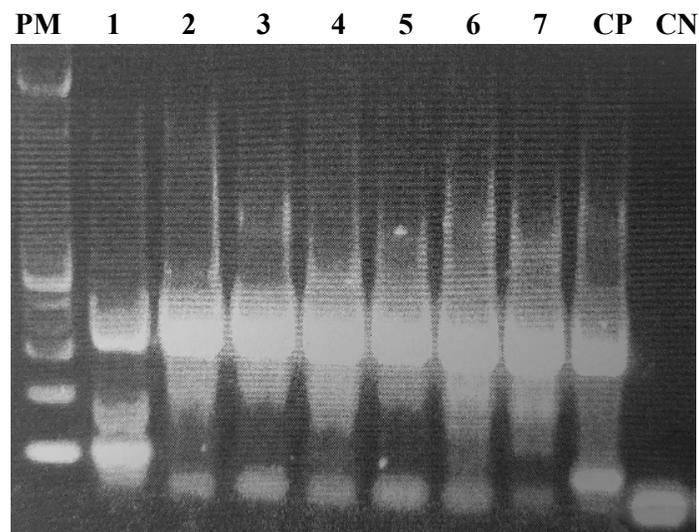


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,2% referente à amplificação de um fragmento de aproximadamente 420pb do gene do capsídeo dos sapovírus estudados, utilizando os *primers* SV-F21/SV-R2. PM: peso molecular 100pb; Canaletas 1 a 7: amostras suspeitas de SaV; CP: Controle Positivo de SaV; CN: Controle Negativo.

### 5.3. Padronização e validação da rRT-PCR

A rRT-PCR foi padronizada e validada utilizando o protocolo de Oka e colaboradores (2006) com modificações, que tem sido usado mundialmente. Os resultados obtidos dos testes de validação e avaliação da eficiência do ensaio de rRT-PCR para SaV utilizado neste estudo seguem registrados abaixo.

#### 5.3.1. Ensaio de Eficiência da rRT-PCR para Sapovírus

O reagente *SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) apresentou resultados mais satisfatórios (curva sigmóide) em relação à *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System* (Promega, EUA) e por esse motivo foi utilizado preferencialmente nos ensaios de validação e avaliação (Figura 8). Para o cálculo da eficiência foram realizadas 6 diluições e 4 replicadas cada (Figura 9, 10).

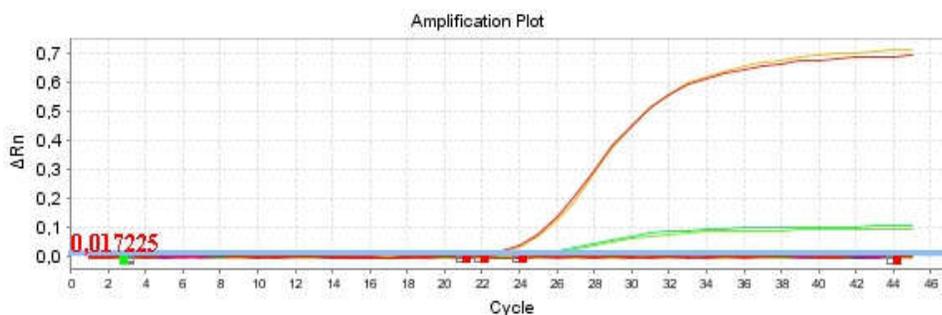


Figura 8. Perfil da absorbância emitida durante cada ciclo no ensaio de rRT-PCR para o CP de sapovírus utilizando diferentes kits de *master mix*. Neste gráfico as linhas vermelhas representam a amostra de CP em duplicata feita com o reagente *SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR* e as linhas verdes, o CP em duplicata feito com o reagente *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System*. Equipamento utilizado: ABI7500 (*Applied Biosystems*,

Foster City, CA, EUA). Os resultados do teste foram interpretados pelo software ABI7500 v2.0.6.

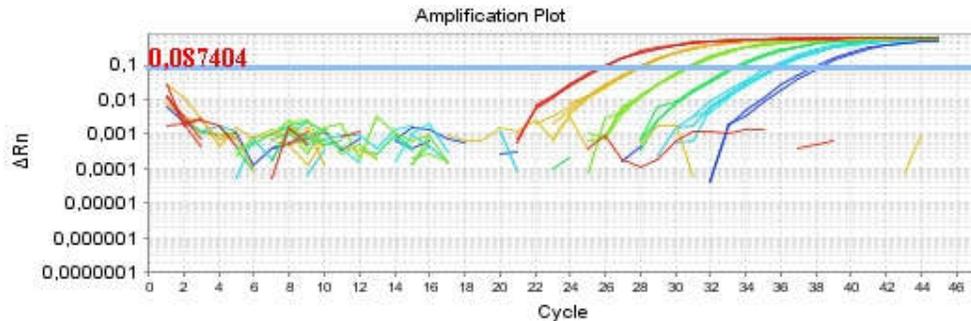
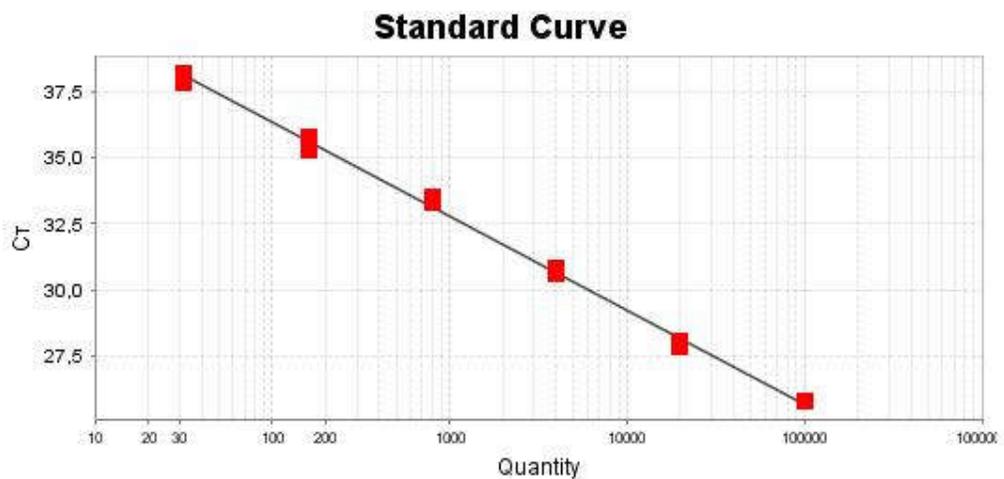


Figura 9. Perfil logarítmico da absorbância emitida durante cada ciclo no ensaio da curva de concentração decrescente para o protocolo de rRT-PCR do CP de sapovírus. Neste gráfico estão incluídas as amostras puras e diluições log 5 para a análise da precisão das medidas. Equipamento utilizado: ABI7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). Os resultados do teste foram interpretados pelo software ABI7500 v2.0.6.



Target: SaV Slope: -3.567 Y-Inter: 43.512  $r^2$ : 0.998 Eff%: 90.685

Figura 10. Curva padrão de eficiência para o ensaio de rRT-PCR para sapovírus, analisado no equipamento ABI7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). Fonte: Registro de resultado de ensaio interpretado pelo software ABI7500 v2.0.6.

Para o cálculo da eficiência das curvas foram selecionados 6 pontos e o número de replicatas entre 3-4.

As informações do desempenho do ensaio de eficiência da rRT-PCR para diagnóstico de SaV estão apresentados na Tabela 8 abaixo:

Tabela 8. Resultados da avaliação do desempenho do ensaio de rRT-PCR para SaV.

| <b><i>Diluição seriada</i></b>            | <b><i>CT médio ± Desvio Padrão</i></b> |
|---|--|
| <b>Puro</b>                               | 25,79 ± 0,02                           |
| <b>1:5</b>                                | 27,92 ± 0,04                           |
| <b>1:5<sup>2</sup></b>                    | 30,77 ± 0,09                           |
| <b>1:5<sup>3</sup></b>                    | 33,32 ± 0,1                            |
| <b>1:5<sup>4</sup></b>                    | 35,58 ± 0,2                            |
| <b>1:5<sup>5</sup></b>                    | 38,02 ± 0,2                            |
| <b><i>Threshold</i></b>                   | 0,087404                               |
| <b><i>Inclinação da curva (slope)</i></b> | -3,567                                 |
| <b><i>Eficiência (%)</i></b>              | 90,685                                 |
| <b><i>R2</i></b>                          | 0,998                                  |
| <b><i>Intercepto com eixo Y</i></b>       | 43,512                                 |

Diluição = diluição do RNA de SaV. *Threshold* = limiar definido pelo software do equipamento considerando o sinal basal de fluorescência e a fase exponencial das curvas amplificadas. CT= número do ciclo onde o sinal de amplificação cruzou o *threshold*.

O coeficiente de correlação entre o sinal produzido pelo aparelho e a concentração do *template* (*R<sub>2</sub>*), e a inclinação da curva (*slope*) corresponderam à eficiência de reação maior que 90% (Tabela 8).

### **5.3.2. Ensaios de sensibilidade, especificidade e repetibilidade da rRT-PCR para Sapovirus**

A avaliação da sensibilidade diagnóstica da rRT-PCR em relação à detecção de SaV foi realizada utilizando um grupo de “verdadeiros positivos” (15 amostras positivas para SaV e que já haviam sido testadas e tiveram resultado negativo para outros vírus que causam gastroenterite, como RVA, NoV, AdV e HAstrV). Todas as amostras foram positivas para SaV por rRT-PCR.

A especificidade foi realizada utilizando um grupo de “verdadeiros negativos” (duas amostras positivas para cada um dos vírus que mais comumente são encontrados em amostras com suspeita de gastroenterite). Todas essas amostras foram negativas para SaV utilizando a mesma metodologia de detecção por rRT-PCR descrita neste estudo.

Para o teste de repetibilidade, foram realizados ensaios em 3 dias consecutivos, com as amostras sendo analisadas em triplicata (Tabela 9). A reprodutibilidade intralaboratorial foi analisada testando as mesmas amostras em triplicata por 2 técnicos diferentes. O ensaio foi avaliado em dois equipamentos disponíveis no Centro de Virologia do IAL (*ABI 7500 Real Time PCR System* e *LightCycler 480®*) e não houve diferenças significativas na leitura qualitativa dos resultados.

Tabela 9. Resultados dos testes de repetibilidade do ensaio de rRT-PCR para sapovírus, analisado no equipamento ABI7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA).

|                  | Dia 01 | Média/Desvio Padrão | Dia 02 | Média/Desvio Padrão | Dia 03 | Média/Desvio Padrão |
|------------------|--------|---------------------|--------|---------------------|--------|---------------------|
| <b>Amostra A</b> | 30,56  |                     | 28,94  |                     | 29,45  |                     |
|                  | 30,75  | 30,62±0,1           | 28,94  | 28,94±0             | 29,91  | 29,77±0,3           |
|                  | 30,55  |                     | 28,94  |                     | 29,96  |                     |
| <b>Amostra B</b> | 32,45  |                     | 31,05  |                     | 32,17  |                     |
|                  | 32,23  | 32,32±0,1           | 31,29  | 31,22±0,1           | 32,4   | 32,2±0,2            |
|                  | 32,28  |                     | 31,32  |                     | 32,05  |                     |
| <b>Amostra C</b> | 29,78  |                     | 28,32  |                     | 28,75  |                     |
|                  | 29,81  | 29,84±0,08          | 28,25  | 28,27±0,05          | 29,22  | 28,95±0,2           |
|                  | 29,94  |                     | 28,35  |                     | 28,89  |                     |
| <b>Amostra D</b> | 31,84  |                     | 34,59  |                     | 35,66  |                     |
|                  | 31,54  | 31,65±0,2           | 34,39  | 34,47±0,2           | 35,42  | 35,72±0,3           |
|                  | 31,58  |                     | 34,23  |                     | 35,08  |                     |

#### 5.4. Avaliação da *nested* RT-PCR em relação ao rRT-PCR

Para avaliar a sensibilidade e especificidade da *nested* RT-PCR em relação a rRT-PCR para a detecção de SaV foi selecionado um grupo de 202 amostras de fezes de crianças menores de 5 anos de idade provenientes das regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul, coletadas no ano de 2017. Um total de 27 amostras foram consideradas positivas, sendo 23 amostras detectadas por *nested* RT-PCR e 26 amostras foram positivas para SaV na rRT-PCR.

Das 27 amostras positivas, 22 apresentaram resultado concordante entre os dois ensaios e cinco amostras apresentaram resultados discordantes. Uma amostra considerada previamente positiva na *nested* RT-PCR foi negativa na rRT-PCR. Por outro lado, 4 amostras previamente negativas na

*nested* RT-PCR tiveram resultados positivos na rRT-PCR (Tabela 10). Os testes foram repetidos para confirmar as discordâncias encontradas.

Tabela 10. Resultados dos casos discordantes entre os ensaios de *nested* RT-PCR e rRT-PCR para SaV.

| <b>Caso</b> | <b>Nested RT-PCR</b> | <b>rRT-PCR</b> | <b>Idade</b> | <b>Sexo</b> | <b>Município</b> | <b>Estado</b> |
|-------------|----------------------|----------------|--------------|-------------|------------------|---------------|
| <b>1</b>    | POSITIVO             | NEGATIVO       | 3 meses      | M           | Goiânia          | GO            |
| <b>2</b>    | NEGATIVO             | POSITIVO       | 2 anos       | M           | Santos           | SP            |
| <b>3</b>    | NEGATIVO             | POSITIVO       | 1 ano        | M           | Goiania          | GO            |
| <b>4</b>    | NEGATIVO             | POSITIVO       | 2 anos       | M           | Anapolis         | GO            |
| <b>5</b>    | NEGATIVO             | POSITIVO       | 2 anos       | M           | Goiania          | GO            |

### **5.5. Análise dos dados de Sapovírus encontrados neste estudo**

Os SaV foram detectados em 149 (3,7%) do total de 3974 amostras coletadas de pacientes de 0 a 91 anos, provenientes das regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil, no período de 2010 a 2017. A taxa de detecção dos SaV variou conforme o ano de coleta (Tabela 11) apresentando diferença estatística significativa ( $\chi^2 = 42,944$ ;  $p < 0,001$ ).

Tabela 11. Apresentação da taxa de detecção de SaV em amostras provenientes das regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, 2010 a 2017.

| <b>Ano de coleta</b> | <b>Total de amostras</b> | <b>Nº amostras positivas</b> | <b>% Positividade</b> |
|----------------------|--------------------------|------------------------------|-----------------------|
| 2010                 | 654                      | 29                           | 4,4%                  |
| 2011                 | 663                      | 11                           | 1,6%                  |
| 2012                 | 657                      | 18                           | 2,7%                  |
| 2013                 | 467                      | 08                           | 1,7%                  |
| 2014                 | 501                      | 16                           | 3,2%                  |
| 2015                 | 341                      | 16                           | 4,6%                  |
| 2016                 | 331                      | 23                           | 6,9%                  |
| 2017                 | 360                      | 28                           | 7,8%                  |
| <b>TOTAL</b>         | <b>3974</b>              | <b>149</b>                   | <b>3,7%</b>           |

Em relação a distribuição dos SaV no estado de São Paulo, percebe-se uma flutuação na taxa de detecção dos SaV, atingindo sua máxima no ano de 2016 (8,9%), apresentando diferença estatística significativa ( $\chi^2 = 38,757$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabela 12).

Tabela 12. Distribuição das amostras positivas para SaV no estado de São Paulo, no período de 2010 a 2017.

| <b>TAXA DE POSITIVIDADE</b> |          |            |
|-----------------------------|----------|------------|
| <b>ANOS</b>                 | <b>%</b> | <b>SP</b>  |
| <b>2010</b>                 | 4,7%     | (29/613)   |
| <b>2011</b>                 | 1,8%     | (10/559)   |
| <b>2012</b>                 | 3,3%     | (18/548)   |
| <b>2013</b>                 | 1,5%     | (8/431)    |
| <b>2014</b>                 | 3,0%     | (14/459)   |
| <b>2015</b>                 | 5,0%     | (15/301)   |
| <b>2016</b>                 | 8,9%     | (21/236)   |
| <b>2017</b>                 | 7,2%     | (22/307)   |
| <b>TOTAL</b>                | 4,0%     | (137/3454) |

Em relação aos outros estados estudados (GO, MS, MT e PR) a taxa de detecção de SaV foi muito baixa, variando de nenhuma detecção a, no máximo, 6 amostras positivas em 2017 no estado de GO. Nas amostras do estado do PR não houve detecção de SaV.

Neste estudo, 1957 amostras eram de pacientes do sexo feminino, e 1993 eram amostras de pacientes do sexo masculino, com positividade para SaV de 58 (2,9%) e 91 (4,6%) das amostras, respectivamente. Em 24 amostras não havia dados informando o sexo dos indivíduos.

A sazonalidade do SaV apresentou flutuações ao longo do ano no período estudado, com exceção dos meses de março que demonstram um pico de crescimento no número de casos.

Todas as faixas etárias apresentaram positividade, porém a faixa etária mais acometida foi a de 0 a 2 anos de idade (5,7%) (Tabela 13). A variação das taxas de positividade entre os grupos etários demonstrou diferença estatística significativa ( $\chi^2 = 51,456$ ;  $p < 0,001$ ).

Tabela 13. Distribuição das amostras positivas para SaV de acordo com a faixa etária de pacientes das regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste no período de 2010 a 2017.

| <b>Faixa etária<br/>(anos)</b> | <b>Total de<br/>amostras</b> | <b>Número de<br/>amostras<br/>positivas</b> | <b>Porcentagem<br/>(%)</b> |
|--------------------------------|------------------------------|---|----------------------------|
| <b>0-2 anos</b>                | 2074                         | 118   | 5,7%                       |
| <b>3-5 anos</b>                | 430                          | 15  | 3,5%                       |
| <b>6-18 anos</b>               | 280                          | 2   | 0,7%                       |
| <b>19-60 anos</b>              | 904                          | 13  | 1,4%                       |
| <b>&gt;60 anos</b>             | 185                          | 1   | 0,5%                       |
| <b>ID</b>                      | 101                          | 0   | 0                          |
| <b>Total</b>                   | 3974                         | 149   |                            |

\*ID – Idade desconhecida

Durante o período deste estudo (2010 a 2017) foram detectados 13 surtos de SaV, todos ocorrendo em SP. Todos os surtos acometeram crianças menores de 3 anos de idade, com exceção de um surto que ocorreu em adultos em hotel na cidade de Santos/SP. Os dados dos surtos seguem na tabela abaixo (Tabela 14).

Tabela 14: Apresentação dos surtos de sapovírus ocorridos no estado de São Paulo no período de 2010 a 2017.

|                 | <b>Ano</b> | <b>Nº casos positivos SaV</b> | <b>Faixa etária (Anos)</b>           | <b>Sexo</b> | <b>Local</b>             | <b>Genótipo</b>          |
|-----------------|------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Surto 1</b>  | 2010       | 4                             | 2 a 3 anos<br>(+1 adulto<br>52 anos) | F/M         | Mocóca                   | GII.2                    |
| <b>Surto 2</b>  | 2010       | 2                             | ≤1 ano                               | M           | São Paulo                | GI.1                     |
| <b>Surto 3</b>  | 2010       | 6                             | ≤1 ano                               | F/M         | São José dos<br>Campos   | GI.1                     |
| <b>Surto 4</b>  | 2011       | 3                             | ≤3 anos                              | M           | Creche /<br>Guarulhos    | GI.2                     |
| <b>Surto 5</b>  | 2012       | 2                             | ≤1 ano                               | M           | São Paulo                | GI.1                     |
| <b>Surto 6</b>  | 2012       | 2                             | ≤1 ano                               | F/M         | Presidente<br>Prudente   | GI.1                     |
| <b>Surto 7</b>  | 2012       | 2                             | ≤3 anos                              | F           | Marília                  | GI.2                     |
| <b>Surto 8</b>  | 2013       | 2                             | ≤1 ano                               | M           | São Paulo                | GI.2                     |
| <b>Surto 9</b>  | 2016       | 4                             | ≤1 ano                               | F/M         | São Paulo                | GI.2/GI.3                |
| <b>Surto 10</b> | 2016       | 5                             | 33 a 44<br>anos                      | F/M         | Hotel / Santos           | GI.2                     |
| <b>Surto 11</b> | 2017       | 7                             | ≤3 anos                              | F/M         | Creche/ São<br>Paulo     | GI.1,<br>GII.5,<br>GIV.1 |
| <b>Surto 12</b> | 2017       | 3                             | ≤1 ano                               | F/M         | São José do Rio<br>Preto | GI.1                     |
| <b>Surto 13</b> | 2017       | 2                             | ≤2 ano                               | M           | Votuporanga              | GI.1                     |

## 5.6. Sequenciamento

O sequenciamento dos SaV foi realizado em 71% (106/149) das amostras positivas encontradas neste estudo, tendo como alvo parte da região da proteína VP1 (~420 pb). Dessas amostras 77 foram classificadas no genogrupo GI, 27 amostras GII e 2 amostras GIV. Dessas, 9 amostras apresentaram sequências menores que 120 pb, não sendo incluídas nas análises filogenéticas.

As sequências dos vírus analisados foram classificadas em 3 genogrupos (GI, GII e GIV) e diversos genótipos. Para as análises de identidade, comparação com as sequências referências e construção da árvore filogenética, as sequências foram divididas em diferentes genogrupos.

### 5.6.1. Genogrupo GI

As 77 amostras do genogrupo GI apresentaram diversos genótipos: 47 cepas GI.1, 23 cepas GI.2, 4 cepas GI.3 e 3 cepas GI.6. De acordo com cada genótipo, as cepas apresentaram identidade nucleotídica entre si que variou de: 85 a 100% para GI.1 (Figura 11, Figura 12), 82 a 100% para GI.2, 93 a 100% para GI.3 e 100% para GI.6 (Figura 13, Figura 14).

A comparação das sequências parciais do gene VP1 das cepas do genogrupo GI identificadas neste estudo e as demais cepas retiradas do *GenBank* evidenciou um percentual de similaridade variando de: 85 a 100% para GI.1, 80 a 100% para GI.2, 87 a 100% para GI.3, 87 a 99% para GI.6.

Devido à baixa similaridade nucleotídica encontrada entre as sequências de GI.1 deste estudo e as 2 cepas brasileiras (KY883438 e KJ826503 – Sapovirus Hu/GI.1/HP06/GO/BR) que estão disponíveis no *GenBank*, com sequência nucleotídica de 221pb e 421pb respectivamente, foi realizada uma análise isolada destas amostras que obteve similaridade nucleotídica de 97 a 100%.



|                     | 36   | 37   | 38   | 39   | 40   | 41   | 42   | 43   | 44   | 45   | 46   | 47   | 48   | 49   | 50   | 51  | 52  | 53  | 54  | 55  | 56  | 57  |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 IAL13_8461/2010   | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 98%  | 100% | 98%  | 52% | 82% | 98% | 98% | 98% | 98% | 97% |
| 2 IAL13_6999/2010   | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 98%  | 100% | 98%  | 52% | 82% | 98% | 98% | 98% | 98% | 97% |
| 3 IAL13_8414/2010   | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 100% | 98%  | 100% | 98%  | 52% | 82% | 99% | 99% | 98% | 98% | 97% |
| 4 IAL01_19022/2010  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 98%  | 100% | 99%  | 52% | 81% | 98% | 99% | 98% | 98% | 97% |
| 5 IAL01_20180/2010  | 98%  | 99%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 99%  | 100% | 99%  | 100% | 99%  | 53% | 82% | 99% | 99% | 98% | 98% | 98% |
| 6 IAL01_24391/2010  | 98%  | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 98%  | 99%  | 98%  | 52% | 81% | 98% | 99% | 98% | 98% | 97% |
| 7 IAL01_38859/2010  | 98%  | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 98%  | 99%  | 98%  | 52% | 81% | 98% | 99% | 98% | 98% | 97% |
| 8 IAL01_15583/2010  | 85%  | 86%  | 85%  | 85%  | 85%  | 86%  | 86%  | 86%  | 85%  | 85%  | 86%  | 87%  | 86%  | 87%  | 86%  | 66% | 68% | 86% | 86% | 85% | 86% | 85% |
| 9 IAL01_15582/2010  | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 99%  | 99%  | 100% | 98%  | 100% | 99%  | 53% | 82% | 99% | 98% | 98% | 98% | 97% |
| 10 IAL01_15584/2010 | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 99%  | 99%  | 100% | 98%  | 100% | 99%  | 53% | 82% | 99% | 98% | 98% | 98% | 97% |
| 11 IAL01_15592/2010 | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 99%  | 99%  | 100% | 98%  | 100% | 99%  | 53% | 82% | 99% | 98% | 98% | 98% | 97% |
| 12 IAL01_18497/2010 | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 98%  | 99%  | 98%  | 52% | 81% | 98% | 98% | 98% | 97% | 97% |
| 13 IAL01_18498/2010 | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 98%  | 99%  | 98%  | 52% | 81% | 98% | 98% | 98% | 97% | 97% |
| 14 IAL01_19015/2010 | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 99%  | 99%  | 100% | 98%  | 100% | 99%  | 53% | 82% | 99% | 98% | 98% | 98% | 97% |
| 15 IAL01_6779/2010  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 98%  | 99%  | 98%  | 52% | 81% | 98% | 98% | 98% | 97% | 97% |
| 16 IAL1013/2011     | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 100% | 99%  | 53% | 82% | 98% | 99% | 98% | 98% | 97% |
| 17 IAL280/2012      | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 98%  | 99%  | 98%  | 52% | 81% | 98% | 98% | 97% | 98% | 97% |
| 18 IAL292/2012      | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 98%  | 99%  | 98%  | 52% | 81% | 98% | 98% | 98% | 97% | 97% |
| 19 IAL279/12        | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 53% | 82% | 99% | 99% | 99% | 98% | 98% |
| 20 IAL564/2012      | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 98%  | 100% | 98%  | 52% | 81% | 98% | 98% | 97% | 98% | 97% |
| 21 IAL693/2012      | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 98%  | 97%  | 98%  | 98%  | 99%  | 98%  | 100% | 98%  | 52% | 81% | 98% | 98% | 97% | 98% | 97% |
| 22 IAL704/2012      | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 53% | 82% | 99% | 99% | 99% | 98% | 98% |
| 23 IAL905/2012      | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 99%  | 99%  | 100% | 98%  | 100% | 99%  | 53% | 82% | 99% | 98% | 98% | 98% | 97% |
| 24 IAL906/2012      | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 99%  | 99%  | 100% | 98%  | 100% | 99%  | 53% | 82% | 99% | 98% | 98% | 98% | 97% |
| 25 IAL154/2013      | 100% | 100% | 99%  | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99%  | 100% | 100% | 98%  | 99%  | 98%  | 100% | 53% | 81% | 98% | 99% | 98% | 99% | 98% |
| 26 IAL208/2013      | 99%  | 100% | 99%  | 99%  | 99%  | 100% | 100% | 100% | 99%  | 99%  | 100% | 99%  | 100% | 98%  | 100% | 53% | 81% | 98% | 99% | 98% | 99% | 99% |
| 27 IAL273/2014      | 98%  | 99%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 98%  | 100% | 98%  | 99%  | 98%  | 53% | 82% | 99% | 98% | 98% | 98% | 97% |
| 28 IAL357/2014      | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 99%  | 99%  | 100% | 98%  | 100% | 99%  | 53% | 82% | 99% | 98% | 98% | 98% | 97% |
| 29 IAL1084/2014     | 100% | 100% | 100% | 99%  | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99%  | 100% | 98%  | 100% | 53% | 81% | 98% | 99% | 98% | 99% | 99% |
| 30 IAL51/2015       | 100% | 100% | 100% | 99%  | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99%  | 100% | 98%  | 100% | 53% | 81% | 98% | 99% | 98% | 99% | 99% |
| 31 IAL652/2015      | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 99%  | 99%  | 100% | 98%  | 100% | 99%  | 53% | 82% | 99% | 98% | 98% | 98% | 97% |
| 32 IAL132/2015      | 89%  | 89%  | 89%  | 88%  | 89%  | 89%  | 89%  | 89%  | 88%  | 89%  | 89%  | 89%  | 88%  | 89%  | 89%  | 63% | 71% | 88% | 88% | 88% | 89% | 87% |
| 33 IAL180/2015      | 100% | 100% | 99%  | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99%  | 100% | 100% | 98%  | 99%  | 98%  | 100% | 53% | 81% | 98% | 99% | 98% | 99% | 98% |
| 34 IAL302/2016      | 98%  | 99%  | 98%  | 98%  | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 98%  | 98%  | 98%  | 100% | 98%  | 99%  | 98%  | 53% | 82% | 99% | 98% | 98% | 98% | 97% |
| 35 IAL124/2017      | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99%  | 98%  | 99%  | 98%  | 99%  | 53% | 81% | 98% | 99% | 98% | 99% | 98% |

|                | 36 | 37   | 38   | 39   | 40   | 41   | 42   | 43   | 44   | 45   | 46   | 47  | 48   | 49   | 50   | 51   | 52  | 53  | 54  | 55  | 56   | 57  |     |
|----------------|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| 36 IAL168/2017 |    | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 98% | 99%  | 98%  | 100% | 53%  | 81% | 98% | 99% | 98% | 99%  | 98% |     |
| 37 IAL207/2017 |    |      | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% | 99%  | 100% | 98%  | 100% | 53% | 81% | 98% | 99% | 98%  | 99% | 99% |
| 38 IAL212/2017 |    |      |      | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99%  | 98% | 99%  | 98%  | 99%  | 53%  | 81% | 98% | 99% | 98% | 99%  | 98% | 98% |
| 39 IAL260/2017 |    |      |      |      | 100% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 100% | 99%  | 98% | 99%  | 98%  | 99%  | 53%  | 81% | 97% | 99% | 98% | 99%  | 98% | 98% |
| 40 IAL131/2017 |    |      |      |      |      | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 98% | 99%  | 98%  | 100% | 53%  | 81% | 98% | 99% | 98% | 99%  | 98% | 98% |
| 41 IAL297/2017 |    |      |      |      |      |      | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% | 98%  | 100% | 53%  | 81% | 98% | 99% | 98% | 99%  | 98% | 99% |
| 42 IAL298/2017 |    |      |      |      |      |      |      | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% | 98%  | 100% | 53%  | 81% | 98% | 99% | 98% | 99%  | 98% | 99% |
| 43 IAL299/2017 |    |      |      |      |      |      |      |      | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% | 98%  | 100% | 53%  | 81% | 98% | 99% | 98% | 99%  | 98% | 99% |
| 44 IAL313/2017 |    |      |      |      |      |      |      |      |      | 100% | 99%  | 98% | 99%  | 98%  | 99%  | 53%  | 80% | 98% | 99% | 98% | 99%  | 98% | 99% |
| 45 IAL332/2017 |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 100% | 98% | 99%  | 98%  | 100% | 53%  | 81% | 98% | 99% | 98% | 99%  | 98% | 99% |
| 46 MG012400    |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 99% | 100% | 99%  | 100% | 53%  | 81% | 98% | 99% | 98% | 100% | 99% | 99% |
| 47 MK111629    |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     | 99%  | 100% | 99%  | 53%  | 82% | 99% | 99% | 98% | 98%  | 98% | 98% |
| 48 MK291481    |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     | 99%  | 100% | 99%  | 53%  | 81% | 98% | 99% | 98% | 99%  | 99% | 99% |
| 49 FJ214051    |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |      | 99%  | 99%  | 53%  | 82% | 99% | 99% | 98% | 98%  | 98% | 97% |
| 50 MK246741    |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |      |      | 99%  | 53%  | 81% | 98% | 99% | 98% | 100% | 99% | 99% |
| 51 KY883438    |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |      |      |      | 53%  | 81% | 98% | 99% | 98% | 100% | 99% | 99% |
| 52 KJ826503    |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |      |      |      |      | 69% | 52% | 53% | 53% | 53%  | 53% | 53% |
| 53 AJ606695    |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |      |      |      |      |     | 81% | 81% | 81% | 81%  | 80% | 80% |
| 54 X86560      |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |      |      |      |      |     |     | 98% | 97% | 98%  | 98% | 97% |
| 55 LN850737    |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |      |      |      |      |     |     |     | 99% | 99%  | 98% | 98% |
| 56 KP298674    |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |      |      |      |      |     |     |     |     | 97%  | 97% | 97% |
| 57 U65427      |    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |      |      |      |      |     |     |     |     |      |     | 98% |

Figura 11. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP1 de sapovírus genótipo GI.1 gerada com o *software BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As sequências de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

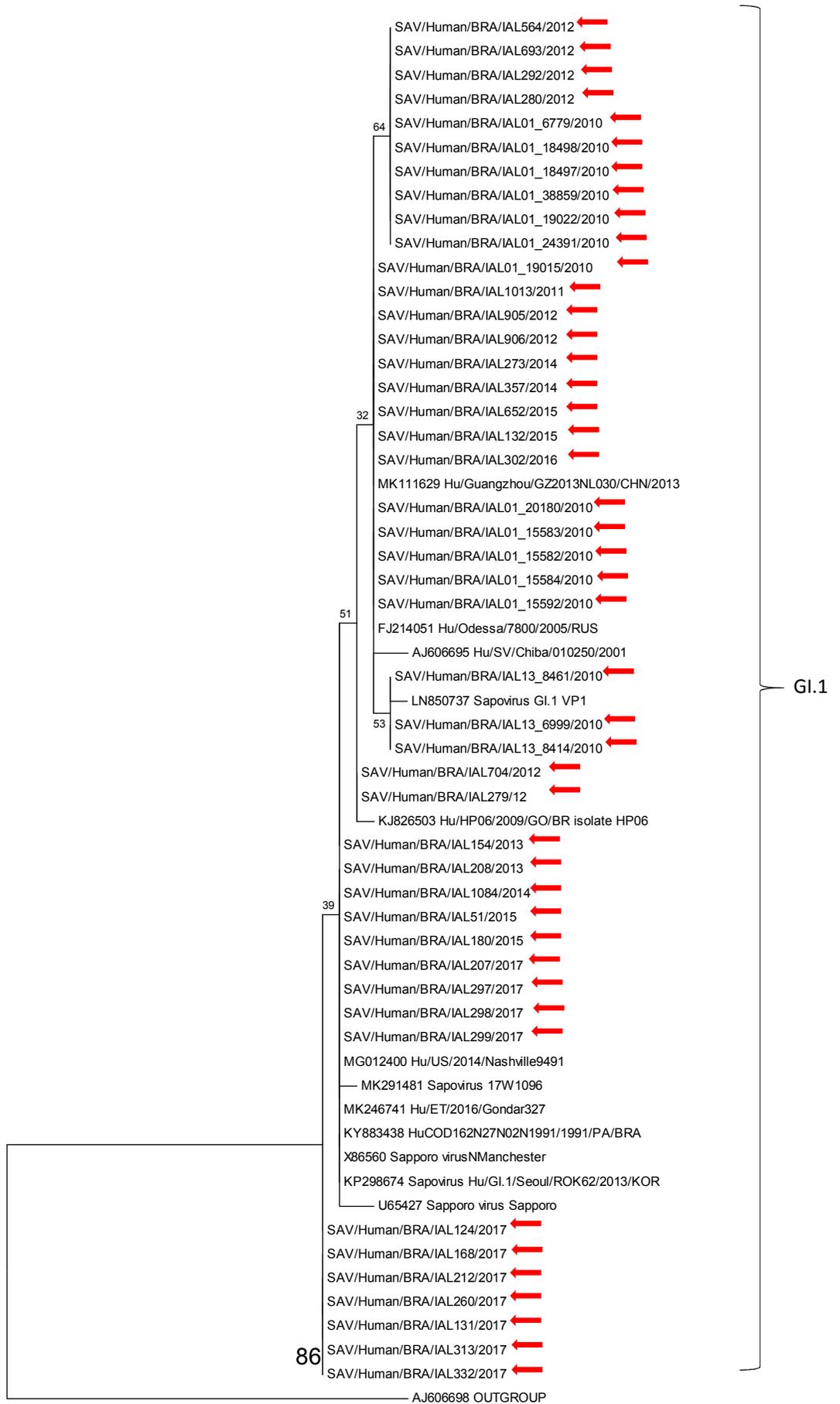


Figura 12. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais da VP1 dos sapovírus do genótipo GI.1 gerada com software MEGA 6.0. Os números 1, 2, 3 e 6 representam os genótipos geneticamente distintos. As amostras sequenciadas neste estudo estão marcadas com setas. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

|                 | 1   | 2   | 3    | 4    | 5    | 6    | 7   | 8   | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21  | 22  | 23   | 24   | 25  | 26   |
|-----------------|-----|-----|------|------|------|------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|------|------|-----|------|
| 1 IAL425/2011   | 91% | 91% | 91%  | 91%  | 91%  | 91%  | 91% | 90% | 83%  | 90%  | 91%  | 91%  | 90%  | 90%  | 90%  | 90%  | 90%  | 91%  | 91%  | 100% | 84% | 78% | 78%  | 78%  | 77% | 77%  |
| 2 IAL856/2012   |     | 99% | 99%  | 100% | 100% | 99%  | 99% | 82% | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 100% | 100% | 91%  | 79% | 82% | 82%  | 82%  | 82% | 82%  |
| 3 IAL429/2011   |     |     | 100% | 99%  | 99%  | 100% | 99% | 82% | 99%  | 100% | 100% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 100% | 100% | 91%  | 79% | 83% | 83%  | 83%  | 82% | 82%  |
| 4 IAL881/2012   |     |     |      | 99%  | 99%  | 100% | 99% | 82% | 99%  | 100% | 100% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 91%  | 79% | 83% | 83%  | 83%  | 83% | 83%  |
| 5 IAL911/2012   |     |     |      |      | 100% | 99%  | 99% | 82% | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 100% | 100% | 91%  | 79% | 82% | 82%  | 82%  | 82% | 82%  |
| 6 IAL912/2012   |     |     |      |      |      | 99%  | 99% | 82% | 98%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 100% | 100% | 91%  | 79% | 82% | 82%  | 82%  | 82% | 82%  |
| 7 IAL166/2013   |     |     |      |      |      |      | 99% | 82% | 99%  | 100% | 100% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 91%  | 79% | 83% | 83%  | 83%  | 82% | 82%  |
| 8 IAL199/2016   |     |     |      |      |      |      |     | 82% | 100% | 99%  | 99%  | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99%  | 99%  | 90%  | 79% | 82% | 82%  | 82%  | 83% | 83%  |
| 9 IAL645/2013   |     |     |      |      |      |      |     |     | 82%  | 82%  | 82%  | 82%  | 82%  | 82%  | 82%  | 82%  | 82%  | 82%  | 82%  | 82%  | 73% | 64% | 68%  | 68%  | 68% | 68%  |
| 10 IAL200/2016  |     |     |      |      |      |      |     |     |      | 99%  | 99%  | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99%  | 99%  | 90%  | 79% | 82% | 82%  | 82%  | 82% | 82%  |
| 11 IAL170/2013  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      | 100% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 91%  | 79% | 83% | 83%  | 83%  | 83% | 83%  |
| 12 IAL176/2013  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 91%  | 79% | 83% | 83%  | 83%  | 82% | 82%  |
| 13 IAL233/2016  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      | 100% | 100% | 100% | 100% | 99%  | 99%  | 90%  | 79%  | 82% | 82% | 82%  | 83%  | 83% |      |
| 14 IAL234/2016  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      |      | 100% | 100% | 100% | 99%  | 99%  | 90%  | 79%  | 82% | 82% | 82%  | 83%  | 83% |      |
| 15 IAL235/2016  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      |      |      | 100% | 100% | 99%  | 99%  | 90%  | 79%  | 82% | 82% | 82%  | 83%  | 83% |      |
| 16 IAL236/2016  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      |      |      |      | 100% | 99%  | 99%  | 90%  | 79%  | 82% | 82% | 82%  | 83%  | 83% |      |
| 17 IAL237/2016  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 99%  | 99%  | 90%  | 79% | 82% | 82%  | 82%  | 83% | 83%  |
| 18 IAL603/2016  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 100% | 91%  | 79% | 83% | 83%  | 83%  | 82% | 82%  |
| 19 IAL115/2017  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 91%  | 79% | 83% | 83%  | 83%  | 82% | 82%  |
| 20 IAL395/2016  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 84% | 78% | 78%  | 78%  | 77% | 77%  |
| 21 IAL260/2011  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     | 93% | 93%  | 93%  | 77% | 77%  |
| 22 IAL202/2016  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     | 100% | 100% | 80% | 80%  |
| 23 IAL480/2014  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |      | 100% | 80% | 80%  |
| 24 IAL198/2016  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |      |      | 80% | 80%  |
| 25 IAL1000/2011 |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |      |      |     | 100% |
| 26 IAL316/2012  |     |     |      |      |      |      |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |      |      |     |      |

|                 | 27  | 28   | 29   | 30   | 31   | 32  | 33  | 34  | 35   | 36  | 37   | 38   | 39  | 40  | 41  | 42  |
|-----------------|-----|------|------|------|------|-----|-----|-----|------|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|
| 1 IAL425/2011   | 77% | 91%  | 91%  | 91%  | 91%  | 89% | 89% | 76% | 91%  | 89% | 91%  | 78%  | 78% | 77% | 85% | 77% |
| 2 IAL856/2012   | 82% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 97% | 97% | 80% | 99%  | 97% | 99%  | 82%  | 82% | 81% | 76% | 82% |
| 3 IAL429/2011   | 82% | 100% | 100% | 100% | 100% | 97% | 98% | 80% | 100% | 97% | 100% | 83%  | 83% | 82% | 76% | 82% |
| 4 IAL881/2012   | 83% | 99%  | 99%  | 100% | 99%  | 98% | 98% | 81% | 100% | 97% | 100% | 83%  | 82% | 82% | 77% | 82% |
| 5 IAL911/2012   | 82% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 97% | 97% | 80% | 99%  | 97% | 99%  | 82%  | 82% | 81% | 76% | 82% |
| 6 IAL912/2012   | 82% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 97% | 97% | 80% | 99%  | 97% | 99%  | 82%  | 82% | 81% | 76% | 82% |
| 7 IAL166/2013   | 82% | 99%  | 99%  | 100% | 99%  | 97% | 98% | 80% | 100% | 97% | 100% | 83%  | 82% | 82% | 76% | 82% |
| 8 IAL199/2016   | 83% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 97% | 97% | 80% | 99%  | 97% | 99%  | 82%  | 83% | 82% | 77% | 82% |
| 9 IAL645/2013   | 68% | 82%  | 82%  | 82%  | 82%  | 81% | 81% | 67% | 82%  | 80% | 82%  | 68%  | 68% | 67% | 62% | 68% |
| 10 IAL200/2016  | 82% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 97% | 97% | 80% | 99%  | 96% | 99%  | 82%  | 82% | 82% | 77% | 82% |
| 11 IAL170/2013  | 83% | 99%  | 99%  | 100% | 99%  | 98% | 98% | 81% | 100% | 97% | 100% | 83%  | 82% | 82% | 77% | 82% |
| 12 IAL176/2013  | 82% | 99%  | 99%  | 100% | 99%  | 97% | 98% | 80% | 100% | 97% | 100% | 83%  | 82% | 82% | 76% | 82% |
| 13 IAL233/2016  | 83% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 97% | 97% | 80% | 99%  | 97% | 99%  | 82%  | 83% | 82% | 77% | 82% |
| 14 IAL234/2016  | 83% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 97% | 97% | 80% | 99%  | 97% | 99%  | 82%  | 83% | 82% | 77% | 82% |
| 15 IAL235/2016  | 83% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 97% | 97% | 80% | 99%  | 97% | 99%  | 82%  | 83% | 82% | 77% | 82% |
| 16 IAL236/2016  | 83% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 97% | 97% | 80% | 99%  | 97% | 99%  | 82%  | 83% | 82% | 77% | 82% |
| 17 IAL237/2016  | 83% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 97% | 97% | 80% | 99%  | 97% | 99%  | 82%  | 83% | 82% | 77% | 82% |
| 18 IAL603/2016  | 82% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 97% | 98% | 80% | 100% | 97% | 100% | 83%  | 82% | 81% | 76% | 82% |
| 19 IAL115/2017  | 82% | 99%  | 99%  | 99%  | 99%  | 97% | 98% | 80% | 100% | 97% | 100% | 83%  | 82% | 81% | 76% | 82% |
| 20 IAL395/2016  | 77% | 91%  | 91%  | 91%  | 91%  | 89% | 89% | 76% | 91%  | 89% | 91%  | 78%  | 78% | 77% | 85% | 77% |
| 21 IAL260/2011  | 77% | 79%  | 79%  | 79%  | 79%  | 79% | 79% | 87% | 79%  | 79% | 79%  | 93%  | 77% | 77% | 81% | 77% |
| 22 IAL202/2016  | 80% | 82%  | 82%  | 83%  | 82%  | 83% | 83% | 91% | 83%  | 82% | 83%  | 100% | 80% | 80% | 75% | 80% |
| 23 IAL480/2014  | 80% | 82%  | 82%  | 83%  | 82%  | 83% | 83% | 91% | 83%  | 82% | 83%  | 100% | 80% | 80% | 75% | 80% |
| 24 IAL198/2016  | 80% | 82%  | 82%  | 83%  | 82%  | 83% | 83% | 91% | 83%  | 82% | 83%  | 100% | 80% | 80% | 75% | 80% |
| 25 IAL1000/2011 | 99% | 82%  | 82%  | 82%  | 82%  | 83% | 82% | 79% | 82%  | 82% | 82%  | 80%  | 98% | 99% | 87% | 98% |
| 26 IAL316/2012  | 99% | 82%  | 82%  | 82%  | 82%  | 83% | 82% | 79% | 82%  | 82% | 82%  | 80%  | 98% | 99% | 87% | 98% |

|                      | <b>28</b> | <b>29</b> | <b>30</b> | <b>31</b> | <b>32</b> | <b>33</b> | <b>34</b> | <b>35</b> | <b>36</b> | <b>37</b> | <b>38</b> | <b>39</b> | <b>40</b> | <b>41</b> | <b>42</b> |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>27 IAL89/2014</b> | 82%       | 82%       | 82%       | 82%       | 83%       | 82%       | 79%       | 82%       | 82%       | 82%       | 80%       | 98%       | 99%       | 87%       | 98%       |
| <b>28 LT841192</b>   |           | 100%      | 99%       | 100%      | 97%       | 98%       | 80%       | 100%      | 97%       | 100%      | 82%       | 82%       | 81%       | 76%       | 82%       |
| <b>29 LT985928</b>   |           |           | 99%       | 100%      | 97%       | 98%       | 80%       | 100%      | 97%       | 100%      | 82%       | 82%       | 81%       | 76%       | 82%       |
| <b>30 KM092508</b>   |           |           |           | 99%       | 97%       | 98%       | 80%       | 100%      | 97%       | 100%      | 83%       | 82%       | 82%       | 76%       | 82%       |
| <b>31 LT985941</b>   |           |           |           |           | 97%       | 98%       | 80%       | 100%      | 97%       | 100%      | 82%       | 82%       | 81%       | 76%       | 82%       |
| <b>32 MK246715</b>   |           |           |           |           |           | 99%       | 81%       | 97%       | 96%       | 97%       | 83%       | 82%       | 82%       | 77%       | 82%       |
| <b>33 MK250988</b>   |           |           |           |           |           |           | 80%       | 98%       | 97%       | 98%       | 83%       | 82%       | 82%       | 76%       | 82%       |
| <b>34 AJ606696</b>   |           |           |           |           |           |           |           | 80%       | 81%       | 80%       | 91%       | 78%       | 79%       | 74%       | 79%       |
| <b>35 AB614356</b>   |           |           |           |           |           |           |           |           | 97%       | 100%      | 83%       | 83%       | 82%       | 76%       | 82%       |
| <b>36 AF294739</b>   |           |           |           |           |           |           |           |           |           | 97%       | 82%       | 82%       | 82%       | 76%       | 82%       |
| <b>37 AB614356</b>   |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | 83%       | 83%       | 82%       | 76%       | 82%       |
| <b>38 MK250989</b>   |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | 80%       | 80%       | 75%       | 80%       |
| <b>39 MN164940</b>   |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | 99%       | 87%       | 98%       |
| <b>40 MG012443</b>   |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | 87%       | 99%       |
| <b>41 KT276527</b>   |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | 87%       |
| <b>42 KU512734</b>   |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |

Figura 13. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP1 de sapovírus genótipo GI.2 (verde), GI.3 (rosa) e GI.6 (amarelo) gerada com o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As sequências de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

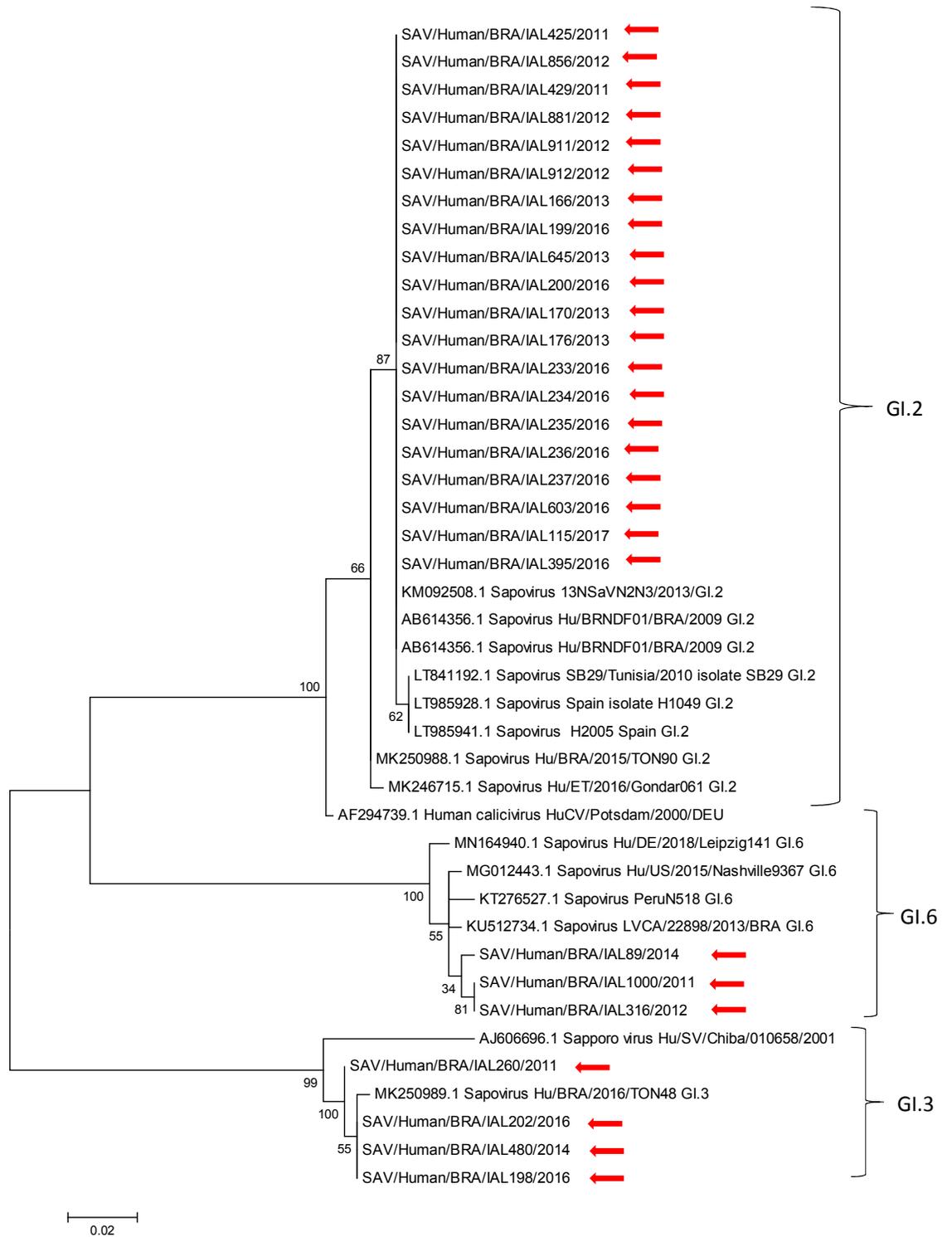


Figura 14. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequências nucleotídicas parciais da VP1 dos sapovírus do genótipo GI.2, GI.3 e GI.6 gerada com software MEGA 6.0. Os números 1, 2, 3 e 6 representam os genótipos geneticamente distintas. As amostras sequenciadas neste estudo estão marcadas com setas. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

### 5.6.2. Genogrupo GII

As 27 amostras do genogrupo GII apresentaram diversos genótipos: 6 cepas GII.1, 9 cepas GII.2, 3 cepas GII.3, 3 cepas GII.4 e 6 cepas GII.5. De acordo com cada genótipo, as cepas apresentaram identidade nucleotídica entre si que variou de: 83 a 99% para GII.1; 72 a 100% para GII.2; 90 a 98% para GII.3; 91 a 99% para GII.4 e 86 a 100% para GII.5 (Figura 15 e Figura 16).

A comparação das sequências parciais do gene VP1 das cepas estudadas do genogrupo GII e as demais cepas retiradas do *GenBank* evidenciou um percentual de similaridade variando de: 81 a 98% para GII.1; 72 a 99% para GII.2; 87 a 95% para GII.3; 91 a 93% para GII.4 e 83 a 96% para GII.5.

No entanto, a cepa (IAL683/2015) genótipo GII.1, com sequência nucleotídica de 260 pb, obteve somente 62 a 79% de identidade nucleotídica comparando com as outras cepas do mesmo genótipo e com as sequências referências do genogrupo retiradas do *GenBank*.

|                                     | 1 | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11   | 12   | 13  | 14  | 15  | 16  | 17  | 18  | 19  | 20  | 21  | 22  | 23  | 24  | 25  | 26  | 27  | 28  | 29  | 30   | 31   | 32  | 33  | 34  | 35  | 36  | 37  |     |
|-------------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 SAV/Human/BRA/IAL1246/2012        |   | 99% | 84% | 83% | 62% | 97% | 97% | 94% | 76% | 68% | 77%  | 77%  | 77% | 65% | 70% | 65% | 55% | 70% | 70% | 70% | 70% | 65% | 65% | 65% | 65% | 65% | 66% | 69% | 60% | 69%  | 69%  | 68% | 58% | 69% | 93% | 94% | 94% |     |
| 2 SAV/Human/BRA/IAL1256/2012        |   |     | 84% | 83% | 62% | 98% | 98% | 93% | 76% | 67% | 77%  | 76%  | 77% | 65% | 70% | 65% | 55% | 70% | 69% | 70% | 70% | 65% | 65% | 65% | 65% | 65% | 66% | 69% | 59% | 69%  | 69%  | 67% | 58% | 68% | 94% | 94% | 95% |     |
| 3 SAV/Human/BRA/IAL376/2013         |   |     |     | 99% | 78% | 82% | 82% | 82% | 66% | 57% | 66%  | 66%  | 66% | 77% | 60% | 54% | 45% | 62% | 62% | 62% | 62% | 70% | 74% | 73% | 73% | 73% | 73% | 63% | 53% | 63%  | 63%  | 71% | 52% | 63% | 79% | 79% | 79% |     |
| 4 SAV/Human/BRA/IAL591/2017         |   |     |     |     | 79% | 83% | 83% | 81% | 66% | 57% | 67%  | 66%  | 67% | 78% | 60% | 55% | 45% | 62% | 62% | 62% | 62% | 70% | 74% | 73% | 72% | 73% | 74% | 63% | 54% | 63%  | 63%  | 72% | 53% | 63% | 80% | 79% | 80% |     |
| 5 SAV/Human/BRA/IAL683/2015         |   |     |     |     |     | 63% | 63% | 68% | 49% | 61% | 50%  | 50%  | 50% | 67% | 55% | 63% | 61% | 47% | 48% | 48% | 47% | 55% | 59% | 58% | 57% | 57% | 58% | 51% | 64% | 51%  | 51%  | 59% | 64% | 50% | 60% | 60% | 60% |     |
| 6 AJ249939 SLV/Bristol/98/UK        |   |     |     |     |     |     | 99% | 92% | 77% | 68% | 77%  | 77%  | 77% | 65% | 70% | 65% | 55% | 70% | 71% | 70% | 70% | 65% | 64% | 64% | 64% | 65% | 66% | 69% | 59% | 69%  | 69%  | 68% | 58% | 68% | 94% | 95% | 96% |     |
| 7 AY237419 Sapovirus Mc2            |   |     |     |     |     |     |     | 92% | 76% | 68% | 77%  | 76%  | 77% | 65% | 70% | 65% | 55% | 70% | 71% | 71% | 70% | 65% | 65% | 65% | 64% | 65% | 66% | 69% | 59% | 69%  | 69%  | 68% | 58% | 68% | 94% | 95% | 96% |     |
| 8 KUS12735LVCA/22501/2013/BRA       |   |     |     |     |     |     |     |     | 72% | 70% | 72%  | 72%  | 72% | 70% | 73% | 67% | 58% | 65% | 65% | 65% | 65% | 64% | 64% | 64% | 64% | 64% | 65% | 68% | 63% | 68%  | 68%  | 69% | 62% | 68% | 88% | 89% | 89% |     |
| 9 AY237420 Sapovirus Mc10           |   |     |     |     |     |     |     |     | 88% | 99% | 99%  | 99%  | 82% | 92% | 85% | 72% | 69% | 68% | 69% | 69% | 69% | 64% | 65% | 65% | 65% | 65% | 65% | 69% | 58% | 69%  | 69%  | 68% | 57% | 68% | 74% | 77% | 75% |     |
| 10 SAV/Human/BRA/IAL296/2015        |   |     |     |     |     |     |     |     |     | 88% | 88%  | 88%  | 78% | 93% | 96% | 84% | 61% | 61% | 61% | 61% | 56% | 58% | 57% | 58% | 57% | 58% | 58% | 62% | 69% | 62%  | 61%  | 68% | 61% | 65% | 68% | 65% |     |     |
| 11 SAV/Human/BRA/IAL564/2015        |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 100% | 100% | 83% | 91% | 85% | 72% | 69% | 68% | 69% | 69% | 64% | 65% | 65% | 65% | 65% | 65% | 65% | 69% | 58% | 69%  | 69%  | 68% | 56% | 68% | 75% | 78% | 75% |     |
| 12 SAV/Human/BRA/IAL81/2014         |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      | 100% | 82% | 91% | 85% | 72% | 69% | 68% | 69% | 69% | 64% | 65% | 65% | 65% | 65% | 65% | 65% | 69% | 58% | 69%  | 69%  | 68% | 57% | 68% | 74% | 77% | 74% |     |
| 13 SAV/Human/BRA/IAL403/2016        |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      | 83% | 91% | 85% | 72% | 69% | 68% | 69% | 69% | 64% | 65% | 65% | 65% | 65% | 65% | 69% | 58% | 69% | 69%  | 68%  | 56% | 68% | 75% | 78% | 75% |     |     |
| 14 SAV/Human/BRA/IAL259/2016        |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     | 81% | 75% | 72% | 60% | 59% | 60% | 60% | 68% | 74% | 73% | 73% | 73% | 73% | 73% | 64% | 56% | 64%  | 64%  | 73% | 55% | 63% | 64% | 66% | 63% |     |
| 15 SAV/Human/BRA/IAL03_21218/2010   |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     | 93% | 80% | 65% | 64% | 64% | 65% | 60% | 61% | 61% | 61% | 61% | 61% | 66% | 65% | 66% | 66%  | 65%  | 64% | 65% | 68% | 71% | 68% |     |     |
| 16 SAV/Human/BRA/IAL03_21214/2010   |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     | 87% | 59% | 59% | 60% | 60% | 55% | 57% | 56% | 57% | 56% | 56% | 61% | 72% | 61% | 61%  | 60%  | 70% | 60% | 63% | 66% | 63% |     |     |
| 17 SAV/Human/BRA/IAL03_21220/2010   |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     | 50% | 50% | 49% | 50% | 45% | 47% | 47% | 48% | 47% | 47% | 51% | 64% | 50% | 50%  | 49%  | 64% | 50% | 53% | 56% | 53% |     |     |
| 18 AJ786350 Hu/SV/Chiba/040507/2004 |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     | 92% | 94% | 94% | 87% | 68% | 68% | 68% | 67% | 69% | 67% | 58% | 66% | 66%  | 66%  | 57% | 66% | 68% | 68% | 69% |     |     |
| 19 AY603425 Sapovirus C12           |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     | 95% | 95% | 87% | 65% | 66% | 67% | 66% | 68% | 58% | 67% | 67% | 67%  | 58%  | 68% | 68% | 68% | 69% | 69% |     |     |
| 20 SAV/Human/BRA/IAL11_9928/2010    |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     | 98% | 90% | 66% | 67% | 67% | 66% | 68% | 68% | 58% | 67% | 67%  | 66%  | 58% | 67% | 69% | 69% | 69% |     |     |
| 21 SAV/Human/BRA/IAL153/2014        |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     | 90% | 67% | 67% | 67% | 66% | 68% | 68% | 58% | 67% | 67%  | 66%  | 57% | 67% | 69% | 69% | 69% |     |     |
| 22 SAV/Human/BRA/IAL13_2359/2010    |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 73% | 74% | 74% | 74% | 75% | 64% | 55% | 64% | 64%  | 73%  | 54% | 63% | 64% | 64% | 64% |     |     |
| 23 SAV/Human/BRA/IAL1082/2011       |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 99% | 98% | 91% | 92% | 64% | 55% | 64% | 64%  | 73%  | 53% | 64% | 64% | 64% | 63% |     |     |
| 24 SAV/Human/BRA/IAL289/2013        |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 99% | 92% | 93% | 64% | 55% | 64% | 64%  | 73%  | 54% | 64% | 64% | 64% | 64% | 63% |     |
| 25 SAV/Human/BRA/IAL244/2016        |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 92% | 93% | 64% | 55% | 64% | 64%  | 73%  | 54% | 64% | 64% | 63% | 64% | 63% |     |
| 26 KX274477 116006/Manaus/2011/BRA  |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 96% | 63% | 54% | 64% | 64%  | 73%  | 54% | 64% | 64% | 64% | 65% | 63% |     |
| 27 AB429084 Kumamoto6/2003/JP       |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 64% | 55% | 64%  | 64%  | 73% | 53% | 64% | 65% | 65% | 64% |     |
| 28 SAV/Human/BRA/IAL193/2016        |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 86% | 100% | 100% | 89% | 83% | 96% | 70% | 70% | 69% |     |
| 29 SAV/Human/BRA/IAL278/2017        |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 86%  | 86%  | 76% | 96% | 83% | 60% | 59% | 59% |     |
| 30 SAV/Human/BRA/IAL270/2017        |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      | 100% | 89% | 83% | 95% | 70% | 70% | 69% |     |
| 31 SAV/Human/BRA/IAL271/2017        |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      | 89% | 83% | 95% | 70% | 70% | 69% |     |
| 32 SAV/Human/BRA/IAL478/2015        |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     | 86% | 88% | 67% | 68% | 66% |     |
| 33 SAV/Human/BRA/IAL1058/2014       |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     | 84% | 59% | 58% | 58% |     |
| 34 MG012448 2015/SantaRosa381       |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     | 70% | 69% | 69% |
| 35 U95645 London/29845              |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     | 93% | 96% |     |
| 36 AJ786351 Ehime/2KN1948/2000      |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     | 92% |     |
| 37 AJ271056 Lyon/598/97             |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |     |     |     |     |     |     |     |

Figura 15. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP1 de sapovírus genótipo GII gerada com o *software BioEdit* (Ibbs Therapeutics, EUA). As sequências de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

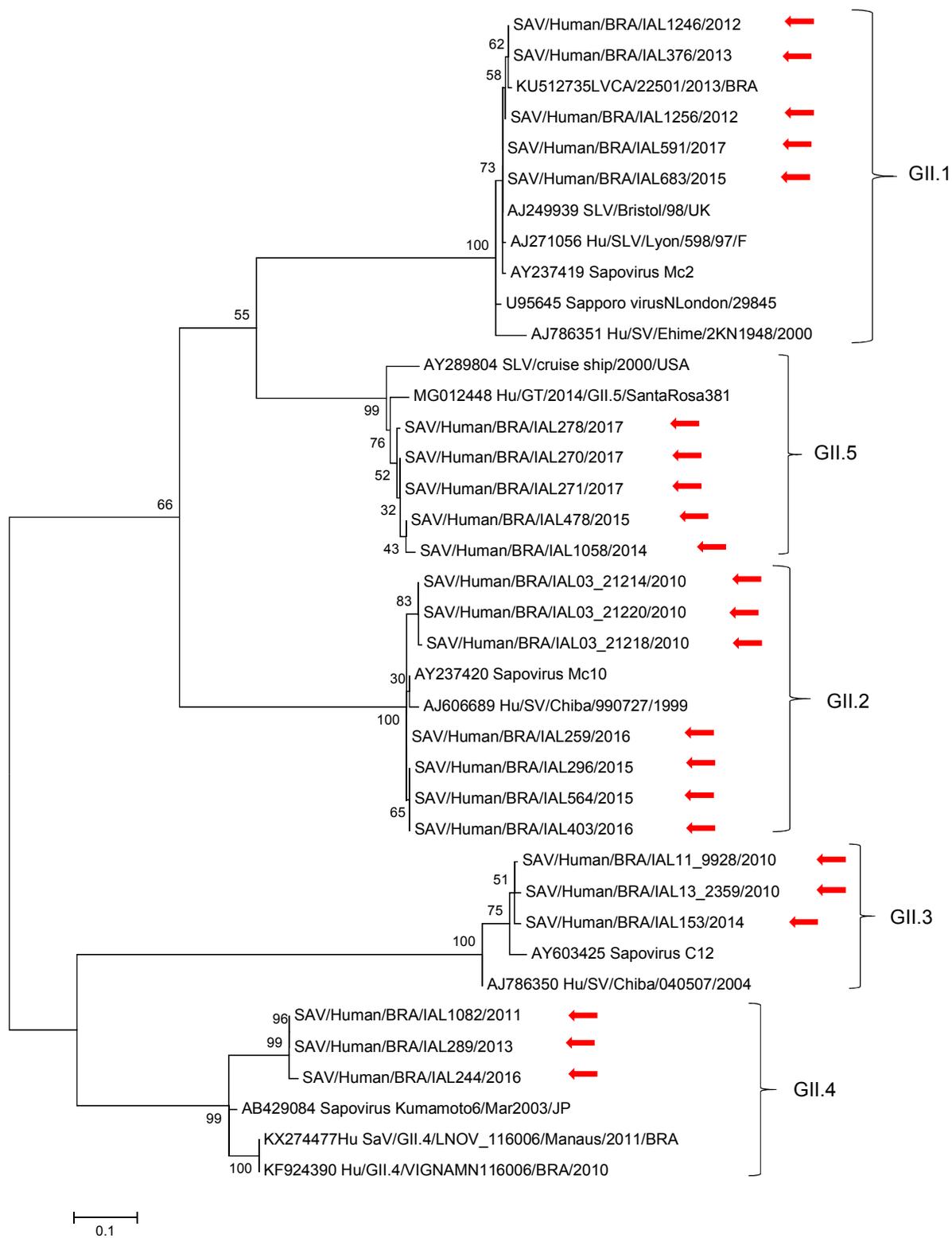


Figura 16. Árvore genealógica do tipo Neighbor-Joining (NJ) das sequencias nucleotídicas parciais da VP1 dos SaV do genogrupo GII gerada com software MEGA 6.0. Os números 1 a 5 representam as genótipos geneticamente distintas. As amostras sequenciadas neste estudo estão marcadas com seta. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados próximos aos nós dos ramos.

### 5.6.3. Genogrupo GIV

As duas sequencias de GIV.1 encontradas neste estudo são até o momento, as únicas sequencias deste genótipo encontradas no Brasil. Elas apresentam 99% de identidade entre si e 95 a 99% de identidade em relação às cepas utilizadas como referências retiradas do *GenBank* (Tabela 15 e Figura 17).

Tabela 15. Matriz de identidade das sequências nucleotídicas parciais do gene VP1 de SaV genogrupo GIV gerada com o *software BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As sequências de referência foram obtidas a partir do *GenBank*.

|                                   | 1 | 2   | 3   | 4   | 5    | 6   | 7   | 8   | 9    | 10  |
|-----------------------------------|---|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|
| 1 IAL14/2017                      |   | 99% | 98% | 98% | 99%  | 98% | 98% | 95% | 98%  | 45% |
| 2 IAL282/2017                     |   |     | 99% | 98% | 99%  | 98% | 98% | 95% | 98%  | 45% |
| 3 Hu/PE/2016/GIV.1/Lima1869       |   |     |     | 99% | 100% | 98% | 98% | 95% | 98%  | 45% |
| 4 Hu/US/2016/GIV.1/Nashville9327  |   |     |     |     | 99%  | 98% | 98% | 95% | 98%  | 45% |
| 5 Hu/GT/2014/GIV.1/Quetzaltenango |   |     |     |     |      | 99% | 99% | 95% | 99%  | 45% |
| 6 Hu/MN/ME08N6133/2008/USA        |   |     |     |     |      |     | 99% | 96% | 100% | 45% |
| 7 Hu/NI/2010/GIV.1/Leon1751       |   |     |     |     |      |     |     | 95% | 99%  | 45% |
| 8 Hu/Pune/NIV085334/2008/India    |   |     |     |     |      |     |     |     | 96%  | 43% |
| 9 Hu/JP/2011/GIV.1/OH11032        |   |     |     |     |      |     |     |     |      | 45% |
| 10 OUTGROUP                       |   |     |     |     |      |     |     |     |      |     |

Números de acesso ao *GenBank* das sequencias usadas como referência em ordem da tabela: MG012431, MG012460, HM800919, MG012454, KU317442, LC081154, HM748973.

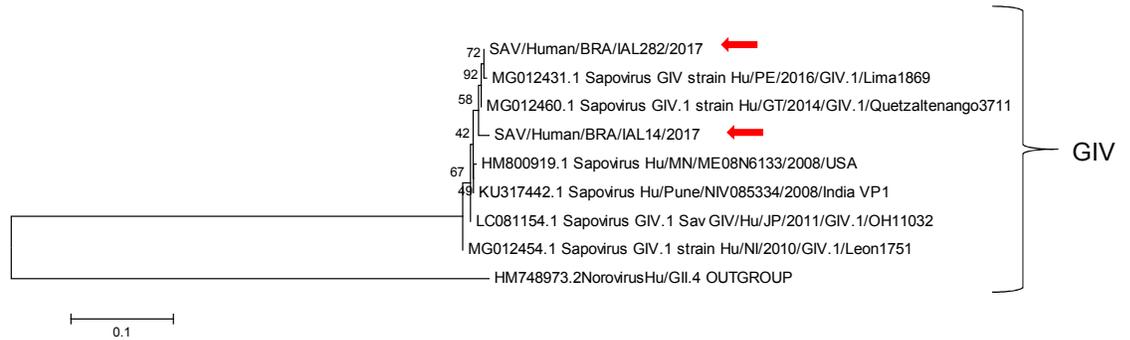


Figura 17. Árvore genealógica do tipo *Neighbor-Joining* (NJ) das sequencias nucleotídicas parciais da VP1 dos SaV do genogrupo GIV gerada com software MEGA 6.0. As cepas sequenciadas neste estudo estão marcadas com a seta. A escala indica a diversidade genética. Percentuais dos valores de *bootstrap* estão localizados nos nós dos ramos.

### 5.7. Resultado da clonagem de Sapovírus

Foram testados 3 µl de cada reação de PCR do DNA plasmidial obtido por eletroforese em gel de agarose 1,2%. A reação de PCR com os *primers* senso e antisenso para SaV amplificou um fragmento de 420 pb correspondente ao tamanho esperado (Figura 18). Os clones foram posteriormente sequenciados e houve a confirmação do genótipo GI.1.

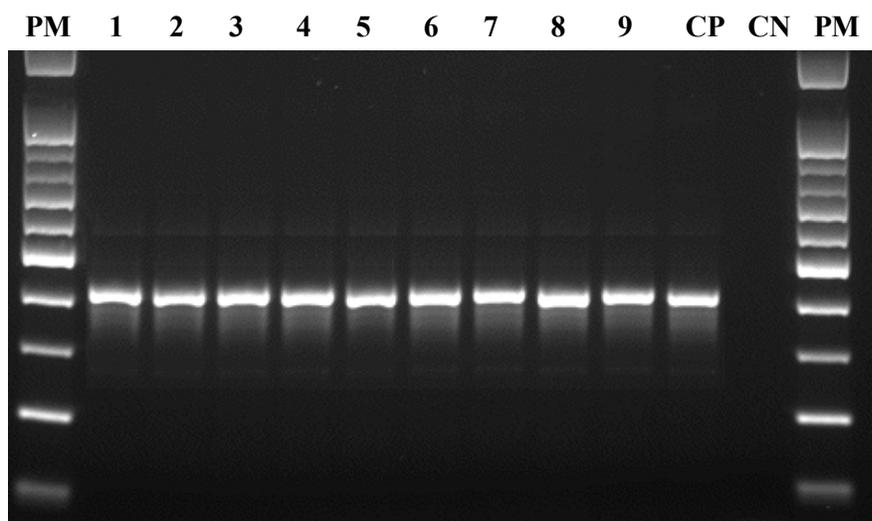


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1,2% referente à amplificação do DNA plasmidial de sapovírus com aproximadamente 420pb. PM: peso molecular 100pb; Canaletas 1 a 9: DNA plasmidial de SaV; CP: Controle Positivo de SaV; CN: Controle Negativo.

Após a transcrição e purificação do RNA clonado dos SaV para obtenção do RNA sintético, uma quantificação foi realizada usando espectrofotometria. Para a transformação de ng/mL para número de cópias, foi utilizado o programa de cálculo recomendado por diversas plataformas *on line*, [www.scienceprimer.com](http://www.scienceprimer.com). Os resultados obtidos foram utilizados no cálculo das diluições ( $10^{12}$  a  $10^5$ ) da curva padrão (Figura 19) e os resultados das diluições seriadas são apresentados na Tabela 16. A maior concentração obtida foi de  $10^{12}$  cópias/mL.

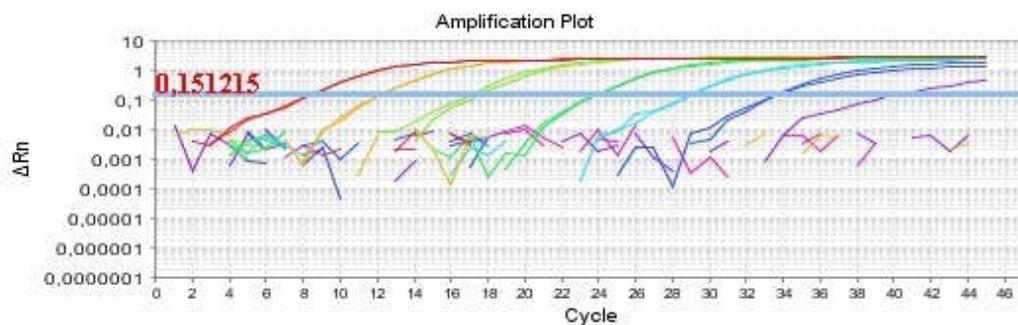


Figura 19. Perfil logarítmico da absorbância emitida durante cada ciclo no ensaio da curva de concentração decrescente para o protocolo de rRT-PCR do clone de sapovírus. Neste gráfico estão incluídas as diluições de  $10^{12}$  a  $10^5$ . Equipamento utilizado: ABI7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). Os resultados do teste foram interpretados pelo software ABI7500 v2.0.6.

Tabela 16. Resultados da avaliação das diluições seriadas ( $10^{12}$  a  $10^5$ ) do clone de SaV.

| <b>Concentração</b>         | <b>CT médio ± Desvio Padrão</b> |        |
|-----------------------------|---------------------------------|--------|
| <b><math>10^{12}</math></b> | 8,35                            | ± 0,01 |
| <b><math>10^{11}</math></b> | 12,20                           | ± 0,05 |
| <b><math>10^{10}</math></b> | 17,33                           | ± 0,4  |
| <b><math>10^9</math></b>    | 23,83                           | ± 0,01 |
| <b><math>10^8</math></b>    | 28,97                           | ± 0,03 |
| <b><math>10^7</math></b>    | 33,61                           | ± 0,08 |
| <b><math>10^6</math></b>    | 0                               |        |
| <b><math>10^5</math></b>    | 0                               |        |

Concentração = número de cópias/mL. Diluição = diluição do RNA de SaV. *Threshold* = limiar definido pelo software do equipamento considerando o sinal basal de fluorescência e a fase exponencial das curvas amplificadas. CT= número do ciclo onde o sinal de amplificação cruzou o *threshold*.

## *DISCUSSÃO*

## 6. DISCUSSÃO

As gastroenterites virais são um importante problema de Saúde Pública em todo o mundo, com alta morbidade e mortalidade em crianças menores de 5 anos de idade (OMS, 2017). Após a introdução da vacina contra rotavírus, outros vírus surgiram como importantes causadores de gastroenterites como, os SaV (Payne et al., 2008).

Ao longo dos anos, os SaV tem se tornado um patógeno de grande importância epidemiológica em todo o mundo. Entre 2004 e 2007, no Canadá, o SaV tornou-se a 3ª causa de infecção viral relacionado à gastroenterite (Pang et al., 2009). Já entre 2008 e 2009, no Reino Unido, os SaV foram considerados a 2ª principal causa de gastroenterite aguda em indivíduos de todas as idades (Tam et al., 2012). Na Nicarágua, os SaV foram considerados a 2ª maior causa de gastroenterite viral, após a introdução da vacina de RV no país (Bucardo et al., 2014). Estudos sobre o meio ambiente sugerem os SaV como patógenos humanos causadores de diarreia, devido à alta prevalência do vírus em rios da Espanha e do Japão (Sano et al., 2011, Kitajima et al., 2010).

As razões para o aumento na porcentagem de detecção de SaV no mundo atualmente, incluem a ocorrência de genótipos emergentes, a implantação da vacina contra rotavírus e o uso de métodos de detecção mais sensíveis (Svraka et al., 2010, Harad et al., 2009, Iritani et al., 2015, Becker-Dreps et al., 2014, Tam et al., 2012).

Atualmente, apesar da importância epidemiológica e distribuição mundial dos SaV, os dados epidemiológicos no Brasil permanecem limitados. No Brasil, há poucos estudos realizados sobre SaV e seu impacto em Saúde Pública. Não existem relatos sobre a ocorrência de SaV no estado de São Paulo, o estado mais populoso do país.

A fim de implantar o diagnóstico de SaV em amostras de fezes com suspeita de gastroenterite viral, duas metodologias foram padronizadas neste estudo: PCR em tempo real (rRT-PCR) e PCR convencional (*nested* RT-PCR). A rRT-PCR obteve 90% de eficiência no ensaio para SaV. Nos ensaios

de sensibilidade e especificidade, a rRT-PCR apresentou 100% de concordância entre as amostras testadas. Em relação à repetibilidade da rRT-PCR não foram observadas diferenças significativas nos resultados obtidos. Portanto, todos os testes necessários para validação da rRT-PCR apresentaram resultados satisfatórios.

O protocolo seguido para padronização da rRT-PCR foi baseado no trabalho de Oka et al. (2006) que é um dos protocolos mais utilizados no mundo, pois apresenta grande sensibilidade e a vantagem de detectar os SaV de todos os genogrupos humanos (GI, II, IV e V), incluindo o genogrupo GV, em uma única reação. O uso do método de reação única (*One-Step*) para realizar a rRT-PCR, ou seja, realizar a transcrição do RNA e amplificação do cDNA em uma única reação, permitiu aumentar a rapidez na execução e a diminuição da possibilidade de contaminação das amostras.

A *nested* RT-PCR demonstrou ser um método muito sensível principalmente com a utilização de um conjunto de *primers* específicos. Assim, a *nested* RT-PCR foi eleita para a realização do *screening* dos SaV em todas as amostras. Este método tem se mostrado muito sensível, sendo amplamente utilizado em estudos mundiais (Okada et al., 2002, 2006, Hansman et al., 2005a, 2005b, Kitajima et al., 2010).

A maior sensibilidade apresentada pela rRT-PCR já era esperada. Muitos estudos afirmam que a rRT-PCR é o teste mais sensível embora, Oka e colaboradores (2006) tenham afirmado que o rRT-PCR tem sensibilidade igual a *nested* RT-PCR. Já, Hansman e colaboradores (2007), afirmam que a *nested* RT-PCR foi mais sensível do que a RT-PCR utilizada em seu estudo.

Neste estudo, os dois principais testes para detecção de SaV, PCR convencional e rRT-PCR, foram padronizados possibilitando implantação de ambos os métodos no laboratório de diagnóstico (NDE) e no futuro, em toda a rede pública de saúde.

No intuito de possibilitar futuros estudos de quantificação de SaV foi preparado um controle positivo padrão, como amostra referência. Esse controle foi obtido pela clonagem molecular da região VP1 de uma amostra de SaV GI.1 e a maior concentração apresentada foi de  $10^{12}$  cópias/mL.

A padronização dos testes de detecção de SaV possibilitou a análise da frequência destes patógenos em 3974 amostras de pacientes com quadro de diarreia aguda que procuraram atendimento médico, durante o período de 8 anos.

A amostragem retrospectiva de conveniência utilizada neste estudo tornou possível a execução desta pesquisa. Apesar da amostragem ser de conveniência, o significado dos resultados obtidos poderão servir de subsídio para elaboração de estratégias de acompanhamento e contenção da doença.

A detecção de SaV foi de 149/3974 (3,7%) das amostras analisadas neste estudo. Esta taxa de detecção variou de acordo com os anos: 1,6% em 2011 a 7,8% em 2017 em indivíduos das regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil. A positividade dos SaV no Brasil encontra-se dentro da faixa de variação de detecção encontrada pelo mundo que é de 2,2 a 15,6% (Oka et al., 2015, Varela et al., 2019).

No Brasil, diferenças na taxa de detecção de SaV também são observadas. Alguns estudos apresentam porcentagens similares aos nossos dados: no estado do Pará (5.2%, 4.9%) (Costa et al., 2017, Aragão et al., 2010) e na cidade de Goiania (4.6%) (de Oliveira et al., 2014). No entanto, baixa frequência foi observada nos estados da Bahia (0.7%) (Xavier et al., 2009), Rio de Janeiro (3.5%) (Fioretti et al., 2016), na cidade de Manaus (3.8%) (Reymão et al., 2016) e, em 5 estados da região semi-árida do Brasil (Paraíba, Ceará, Pernambuco e Piauí) (3.0%) (Lima et al., 2019). Dos dados apresentados nos estudos brasileiros de detecção de SaV em crianças, somente Portal e colaboradores (2016) apresentaram detecção superior à encontrada neste estudo, 9,8% em amostras do estado de Maranhão.

Acredita-se que existam duas explicações para a grande amplitude nas taxas de detecção. Primeiramente, sabe-se que há diferença em relação à sensibilidade nos métodos disponíveis para detecção dos SaV, causando discrepância nas taxas de positividade de acordo com o ensaio utilizado (Kitajima et al., 2010). Além disso, a gastroenterite por SaV geralmente está associada à sintomas leves a moderados que nem sempre necessitam de cuidados médicos específicos, levando à sub-notificação.

Neste estudo não foi possível estudar a soroprevalência dos SaV, pois o NDE somente recebe amostras de fezes para diagnóstico de vírus causadores de gastroenterite. No entanto, deve-se considerar também que estudos soropidemiológicos de infecções por SaV sugerem que a taxa de soroprevalência aumenta gradualmente com a idade, mantendo-se elevada (80 a 100%) no soro de adultos o que aumenta a imunidade de indivíduos desta faixa etária (Nakata et al., 1985, Farkas et al., 2006, Bucardo et al., 2012).

Kunthip et al. (2020) também sugere que diferenças nos locais estudados, os métodos de detecção utilizados, número de amostras testadas ou a emergência de novas amostras epidêmicas podem explicar a grande variação na taxa de detecção de SaV pelo mundo. Os métodos de diagnóstico utilizados nos estudos mundiais variaram enormemente, assim como, o número de amostras testadas. A grande maioria dos estudos brasileiros usou a detecção por PCR convencional utilizando diferentes *primers* e para a caracterização genotípica, o sequenciamento parcial. Somente os estudos realizados em Belém (Costa et al., 2017) e Rio de Janeiro (Fioretti et al., 2016), usaram além dos testes moleculares clássicos, a rRT-PCR.

No presente trabalho, as amostras testadas para SaV foram obtidas de indivíduos de todas as idades, com gastroenterite aguda, provenientes de surtos ou casos esporádicos, que buscaram ajuda em centros médicos. Nos casos de diarreia em adultos, há subnotificação pois este grupo etário raramente busca diagnóstico e tratamento para gastroenterites. Adultos infectados por RVA e NoV normalmente apresentam sintomas moderados; poucos apresentam maior gravidade necessitando de auxílio médico (Chhabra et al., 2013).

Neste estudo, os SaV foram detectados em todas as faixas etárias estudadas. Entretanto, crianças menores de 2 anos foram as mais acometidas, com taxa de positividade de 5,7% (118/2074). Diversos relatos de literatura reportam maior positividade de SaV em crianças menores de 5 anos, sendo que as crianças com até 2 anos de idade são as mais acometidas (Dey et al. 2007, Grant et al. 2017). Magwalivha e colaboradores (2018)

relatam que a taxa de detecção de SaV no mundo é prevalente nas crianças e varia enormemente, de 0,2 a 39%. Altas taxas de detecção (17%) foram relatadas na Nicarágua, (Bucardo et al., 2014) em casos de diarreia aguda em crianças entre 2009 e 2010. No Peru, 11,5% das crianças menores de 2 anos de idade foram detectadas com SaV (Sanchez et al., 2018). Na Espanha, os SaV foram detectados em todas as faixas etárias, porém com alta incidência em crianças menores de 2 anos (19,5%) e em crianças de 3 a 5 anos (17,9%) no período de 2010 a 2011 (Varela et al., 2019). Já nas Filipinas, a taxa de positividade para SaV foi de 7% em crianças no período de 2012 a 2013. Em países africanos, 5% das crianças menores de 5 anos de idade já foram infectadas por SaV (Makhaola, et al., 2020).

Os casos de infecções por SaV em crianças menores de 2 anos de idade confirmam os achados globais de que estes são importantes patógenos causadores da diarreia infantil (Oka et al., 2015, Bucardo et al., 2014). A diarreia infantil causada por vírus entéricos dissemina-se principalmente por contato pessoa a pessoa, água/ alimentos contaminados e superfícies/objetos contaminados. Portanto, crianças são mais vulneráveis do que adultos devido à exposição ambiental sofrida e por seu sistema imune menos desenvolvido. Além disso, é esperado que a quantidade de anticorpos neutralizantes contra SaV aumente com a idade, impedindo reinfecções (Oka et al., 2015). Esses fatos podem explicar a menor frequência de SaV em indivíduos adultos, confirmando o que foi observado neste estudo.

A prevalência de gastroenterite aguda em crianças menores de 2 anos de idade também demonstra que esta faixa etária é mais predisposta à desordens hidroeletrólíticas e sintomas clínicos mais severos devido à imaturidade imunológica (Costa et al., 2017).

Neste estudo foram detectados 13 surtos de SaV todos ocorrendo no estado de São Paulo, no período de 2010 a 2017. Doze surtos acometeram crianças menores de 2 anos de idade, incluindo surtos em 2 creches. Um único surto ocorrido em 2016 em hotel na cidade de Santos, SP, acometeu 5 adultos com idades entre 33 a 44 anos. A falta de dados clínicos sobre estes pacientes impossibilitou fazermos mais análises epidemiológicas.

A detecção dos SaV em surtos de gastroenterite tem aumentado consideravelmente em todo o mundo (Oka et al., 2015). Diversos surtos de SaV ocorrem em crianças (Nakata et al., 2000), embora alguns surtos em adultos também tenham sido descritos (Pang et al., 2009, Lee et al., 2012, Johansson et al., 2005). Torner e colaboradores (2016) documentaram o SaV como agente causador de 3 surtos (2 afetando crianças e 1 em pacientes adultos) na Catalonia. No Brasil, de Oliveira et al. (2014) relatou 2 surtos em crianças assintomáticas, no período de 2009 a 2011.

Nenhum surto em idosos foi relatado neste estudo. Em 2010, Svraka e colaboradores descreveram surtos em pessoas com mais de 60 anos de idade, nos Países Baixos. Nos EUA e Canadá, também foram relatados surtos de SaV em asilos, em pacientes com mais de 65 anos (Lee et al., 2012, Pang et al., 2009). Esses relatos sugerem um aumento da circulação dos SaV nessa faixa etária, fato este não observado em nosso estudo.

Na literatura, um dos maiores surtos descritos de SaV foi associado a transmissão via alimentos contaminados por manipuladores e acometeu 655 pessoas no Japão (Kobayashi et al., 2012). Dewey-Mattia et al. (2018) relataram os SaV como o 3º agente viral mais detectado em surtos de transmissão alimentar nos EUA, causando cerca de 8 surtos no período de 2009 a 2015. Devido à característica retroativa do presente estudo, não foi possível obter amostras ambientais ou alimentares dos surtos aqui estudados.

Em relação aos indivíduos foi analisada a mesma proporção de amostras para ambos os sexos, sendo observada maior prevalência de infecção de SaV em pacientes do sexo masculino (61,1%). Este parece ser um achado, pois a maioria dos relatos em literatura não evidencia diferença significativa da infecção em relação ao sexo (Johsen et al., 2009, Liu et al., 2015, Mann et al., 2019, Kumthip et al., 2020).

A sazonalidade da infecção por SaV não pôde ser definida no presente estudo, pois apresentou flutuações ao longo do ano, com exceção dos meses de março que demonstram um pico de crescimento no número de casos. Poucos estudos conseguem definir os padrões de sazonalidade do SaV. Alguns estudos definem que a maioria das infecções ocorrem nas estações

frias (Oka et al., 2015, Dey et al., 2012). No entanto, outros estudos relatam infecções ocorrendo ao longo do ano (Dove et al., 2005).

Jonhsen e colaboradores (2009) acompanharam por 2 anos (2005 a 2007) crianças menores de 3 anos na Dinamarca, o que possibilitaria aferir a sazonalidade de qualquer agravo, porém não conseguiram observar um padrão sazonal para SaV. Relataram somente um pico de positividade em Dezembro de 2005 e um mês sem coleta de amostras positivas em Julho de 2006. Alguns trabalhos afirmam que no Japão, o SaV é mais frequente nos meses de inverno (Kitajima et al., 2010, Harada et al., 2009). Lee e colaboradores (2012) sugeriram que o SaV, assim como os NoV, teriam a mesma distribuição sazonal ocorrendo nos meses de inverno e seriam indistinguíveis em relação as características clínicas e epidemiológicas, sendo necessário testes laboratoriais para diferenciação. Pang e colaboradores (2000) sugeriram a sazonalidade do SaV no Canadá com pico entre Março e Maio, porém não é um padrão tão claro como o observado para RVA ou NoV. Segundo Makhaola e colaboradores (2020) também não há um padrão sazonal claro em países da África, com exceção de picos de infecção no inverno na Tunísia, nos meses frios e secos em Burkina Faso e picos nos meses chuvosos no Malawi. Mais estudos epidemiológicos em todo o mundo são necessários para que se possa inferir um padrão sazonal da infecção para SaV em humanos.

Esta tese apresenta os primeiros dados sobre a frequência e caracterização molecular dos SaV circulantes no estado de São Paulo. A maioria das amostras estudadas foram provenientes de São Paulo, além de amostras provenientes dos estados de abrangência da referência macro-regional do IAL (MT, MS, GO e PR).

As amostras provenientes de São Paulo apresentaram flutuação na taxa de detecção dos SaV, atingindo sua máxima no ano de 2016 (8,9% - 21/236). Dessas amostras, 14/180 foram positivas para crianças menores de 2 anos.

Em relação aos estados de GO, MS e MT a taxa de detecção de SaV foi muito baixa ou ainda, inexistente, como em amostras provenientes do PR.

A baixa taxa de detecção em outros estados pode ser explicada pelo número reduzido de amostras analisadas oriundas destes locais.

No presente relato, 71% das amostras foram geneticamente caracterizadas por sequenciamento parcial da VP1. A limitação para realizarmos a genotipagem de todas as amostras presentes neste estudo foi devido à qualidade e/ou baixa concentração do RNA genômico contido em algumas amostras.

Em relação à epidemiologia molecular, houve predominância de detecção do genogrupo GI (72,6%), seguido do genogrupo GII (25,5%) e GIV (1,9%). Apesar da variedade de genótipos circulantes no mundo, os genogrupos de SaV, GI (GI.1 e GI.2) e GII (GII.1 e GII.2) são predominantes enquanto que os genogrupos GIV e GV tem sido pontualmente detectados (Diez-Valcarce et al., 2018, Magwalivha et al., 2018). O genogrupo GI é normalmente associado à sintomas mais graves e frequentemente detectado em pacientes com gastroenterite (Matussek et al., 2015, Bucardo et al., 2014, Magwalivha et al., 2018).

Neste estudo foi observada a presença de genótipos distintos: GI.1 (44,3%), GI.2 (21,7%), GI.3 (3,8%), GI.6 (2,8%), GII.1 (5,7%), GII.2 (8,5%), GII.3 (2,8%), GII.4 (2,8%), GII.5 (5,7%) and GIV.1 (1,9%).

Estudos realizados em Belém (PA) nos anos de 1990-1992 detectaram os genótipos GI.1, GI.7, GII.1 e GV.2 (Costa et al., 2017); em 2003 os genótipos GI.1, GI.2 e GII.1 (Aragão et al., 2010a) e, em 2008-2010, GI.1 e GI.2 (Aragão et al., 2013b). Na cidade de Manaus, os genótipos GII.2 e GII.4 foram relatados no período de 2010-2011 (Reymão et al., 2016). Os genótipos GI.1, GI.2, GI.6, GII.1 and GV.1 foram geneticamente caracterizados no Rio de Janeiro entre 2012 a 2014 (Fioretti et al., 2016). Em Goiás, os genótipos GI.1 e GI.3 foram descritos em crianças com diarreia no período de 2009 a 2011 (De Oliveira et al., 2014). Estes estudos demonstram a predominância dos genótipos GI e GII no Brasil, corroborando os dados apresentados neste estudo.

Em relação aos genótipos, GI.1 foi o genótipo mais presente neste estudo e é considerado o mais prevalente no mundo, apesar da circulação de

diversos outros genótipos. Este fato foi constatado por diversos estudos. Jonhsen e colaboradores (2009), relataram que 48% das amostras positivas de crianças foram genotipadas como GI.1, no período de 2005 a 2007 na Dinamarca. Esta afirmação condiz com o estudo do Reino Unido, no qual 61% das amostras apresentaram genótipo GI.1 (Gallimore et al., 2006). Chhabra e colaboradores (2013) também relataram maior positividade de SaV genótipo GI.1 circulando em crianças nos EUA entre 2008 e 2009.

Na Tailândia, GI.1 predominou durante o período de 2000 a 2005, sendo posteriormente, substituído pelo genótipo GII.3. No entanto, o GI.1 emergiu em 2010 e 2011 e permanece circulando naquele país (Kumthip et al., 2017).

O genótipo GI.2 foi o segundo mais frequente neste estudo. Recentemente causou surtos em diversos países na Europa, China, EUA, Canadá, Nicarágua, África do Sul (Svraka et al., 2010, Wang et al., 2014, Chhabra et al., 2013, Pang et al., 2009, Wu et al., 2008, Bucardo et al., 2014, Murray et al., 2016). Este genótipo está associado a surtos de gastroenterite (Mans et al., 2014). No presente estudo, detectou-se um surto de diarreia em adultos causado pelo genótipo GI.2.

O genótipo GI.3 tem sido associado a casos esporádicos no Brasil e ao redor do mundo. Em 2018, o GI.3 causou surto de gastroenterite em escola primária na Korea, afetando crianças e funcionários (Cho et al., 2020).

Nossos dados constataram que dois surtos foram causados pelo SaV genogrupo GII. Este genogrupo foi considerado predominante em pacientes ambulatoriais com diarreia em Burkina Faso, sugerindo que este genogrupo possa ser menos virulento e necessite menor número de hospitalizações (Matussek et al., 2015). Nas Filipinas, no período de 2012 a 2013, o genótipo GII.1 apresentou alta taxa de detecção em crianças hospitalizadas (Liu et al., 2015). Na Guatemala, o genogrupo GII apresentou maior incidência (28%) comparado ao GI (8%), afetando crianças menores de 5 anos, entre 2014 a 2015.

Os genótipos GI.6, GII.4 e GII.5 são considerados incomuns. Neste estudo, os genótipos GI.6 e GII.4 estavam relacionados a casos esporádicos.

Já as cepas de GII.5 foram provenientes de casos esporádicos ocorridos entre 2014 e 2016 e de surto em creche no estado de São Paulo em 2017. Até o momento, a ocorrência do genótipo GII.5 somente havia sido relatada em alguns países do mundo como Japão, Guatemala, Peru, África do Sul, EUA e Tailândia (Oka et al., 2017, Diez-Valcarce et al., 2018, Liu et al., 2016, Murray et al., 2016, Kumthip et al., 2020).

O genótipo GII.5 foi detectado em um surto alimentar que acometeu 78 adultos com idade entre 18 e 27 anos no Japão em 2010 (Oka et al., 2017). Em outro relato, Kumthip e colaboradores (2020) observaram uma alta taxa de GII.5 (16%, 8/50) em seu estudo na Tailândia. A maioria dos pacientes pertenciam ao mesmo hospital e todas as amostras foram detectadas no ano de 2018, sugerindo sua circulação no país neste período.

Foram identificadas duas cepas do genótipo GIV.1, que até o momento, são as únicas descritas no Brasil. O genótipo GIV é raramente detectado se comparado aos genogrupos GI e GII, no entanto, tem sido descrito em países como Burkina Faso, China, Reino Unido, EUA e Venezuela (Matussek et al., 2015, Wang et al., 2014, Lee et al., 2012, Gonzalez et al., 2011). O genótipo emergente GIV foi predominantemente detectado em crianças hospitalizadas com gastroenterite na África do Sul, no período de 2009 a 2013 (Murray et al., 2016). Este genótipo tem sido relatado associado à surtos na Europa, Canadá e Japão (Svraka et al., 2010, Pang et al., 2009, Yoshida et al., 2009) e surtos em asilos nos EUA e Canadá (Pang et al., 2009, Lee et al., 2012). No Japão, o GIV emergiu no ano de 2007 (Harad et al., 2009).

A diversidade genética dos SaV identificados foram comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados (*GenBank*). As sequências nucleotídicas do genogrupo GI apresentaram alta similaridade entre si: 85 a 100% para GI.1, 82 a 100% para GI.2, 93 a 100% para GI.3, 100% para GI.6. Relacionando as amostras deste estudo com cepas obtidas no *GenBank* evidenciou-se um percentual de similaridade variando de: 85 a 100% para GI.1, 80 a 100% para GI.2, 87 a 100% para GI.3, 87 a 99% para GI.6.

As cepas de genótipo GI.1 brasileiras depositadas no *GenBank* (KY883438 e KJ826503 – Sapovirus Hu/GI.1/HP06/GO/BR) apresentam

sequências nucleotídicas de somente 221pb e 421pb, por este motivo, foi realizada a comparação destas cepas com as sequencias obtidas neste estudo de forma isolada, obtendo-se similaridade nucleotídica de 97 a 100%.

Todas as sequencias do genótipo GI.1 foram similares às cepas da China, EUA, Irlanda, Rússia, Etiópia, Japão e Korea. Em relação ao genótipo GI.2, houve similaridade com cepas do Brasil, Tunisia, Espanha, Etiópia e Alemanha; o genótipo GI.3 apresentou similaridade nucleotídica com Brasil e Japão. Já as amostras do genótipo GI.6 foram mais similares às cepas dos EUA, Alemanha, Peru e Brasil.

As cepas do genogrupo GII apresentaram identidade nucleotídica com variação entre si de: 83 a 99% para GII.1; 72 a 100% para GII.2; 90 a 98% para GII.3; 91 a 99% para GII.4 e 86 a 100% para GII.5 A comparação das sequências de GII e as demais cepas encontradas no *GenBank* evidenciou um percentual de similaridade variando de: 81 a 98% para GII.1 entre cepas oriundas de Inglaterra, Nicaragua, Japão, Tailândia e Reino Unido; 72 a 99% para GII.2 comparando à cepa do Tailândia e Japão; 87 a 95% para GII.3 entre cepas do Japão; 91 a 93% para GII.4 entre cepas do Japão e Brasil e 83 a 96% para GII.5 comparando à cepa da Guatemala e EUA.

A cepa (IAL683/2015) possível genótipo GII.1, com sequência nucleotídica de 260 pb, obteve somente 62 a 79% de identidade nucleotídica comparando com as outras cepas do mesmo genótipo e com as sequencias referências do genogrupo encontradas do *GenBank*. Mais estudos serão necessários para confirmação da genotipagem desta amostra, incluindo o uso de *primers* para outras regiões da ORF1.

Pela primeira vez detectadas no Brasil, as cepas de GIV.1, apresentaram alta identidade comparada às cepas encontradas no *GenBank* (95 a 99%) que incluem sequencias de diversos países como: Peru, Nicarágua, EUA, Índia e Japão, demonstrando ser esta cepa muito conservada.

Apesar da sensibilidade das metodologias utilizadas não foram detectadas amostras do genogrupo GV. Este genogrupo raramente é detectado quando comparado a outros genogrupos de SaV (Matussek et al.,

2015). No Brasil, o GV foi detectado por Costa et al. (2017) em crianças menores de 2 anos em Belém (Pará), entre os anos de 1990 e 1992; e por Fioretti et al. (2016), no Rio de Janeiro, em pacientes no período de 2012 a 2014. Em sua recente revisão, Makhaola et al. (2020) apresentou 18 estudos sobre dados de SaV humanos na África, porém nenhum SaV genogrupo GV foi detectado nestes trabalhos.

Uma das limitações do presente estudo é que não se pôde determinar a ocorrência de coinfeções que são comuns aos vírus que causam gastroenterite (Iizuka et al., 2010, Iritani et al., 2014, Lyman et al., 2009, Rasanen et al., 2010). As amostras selecionadas para este estudo foram de conveniência e o diagnóstico diferencial foi realizado para surtos e casos esporádicos de diarreia aguda com suspeita de infecção viral que não tinham sido confirmados como RVA, NoV ou AdV. Assim, somente foram estudados casos em que o agente viral causador da gastroenterite não havia sido confirmado dentre os mais comumente encontrados.

Até o momento, os dados em literatura sobre detecção, genotipagem e epidemiologia de SaV no Brasil, ainda são muito escassos. No entanto, os dados epidemiológicos e moleculares apresentados fornecem subsídios para afirmar que os SaV tem papel importante na ocorrência de surtos e casos de gastroenterite, principalmente em crianças das regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil.

Os 13 surtos apresentados demonstram a importância do estudo dos SaV e sua epidemiologia. Não há sistema de vigilância para gastroenterites causadas por SaV nos países em desenvolvimento causando subnotificações de casos esporádicos e surtos (Magwalivha et al., 2018). Podemos então sugerir a necessidade de implantação do diagnóstico de SaV nos programas de monitoramento de diarreia aguda, como diagnóstico diferencial para casos de gastroenterite aguda sem identificação de agente etiológico.

Pela primeira vez, os SaV foram detectados e caracterizados molecularmente em amostras provenientes do estado de São Paulo. Os dados coletados contribuirão para entendermos melhor a epidemiologia do

SaV no Brasil, a fim de desenvolver a vigilância ativa deste patógeno envolvido em diversos surtos em São Paulo.

Os dados de caracterização molecular demonstraram a circulação de genótipos incomuns, como GI.6, GII.5 e GII.4. Mais estudos são necessários para entendermos o potencial de re-emergência destes genótipos.

De todos os casos com suspeita de gastroenterite viral enviados ao NDE no período deste estudo (2010 a 2017), 46,6% das amostras não tiveram seu agente etiológico identificado. O diagnóstico diferencial de SaV neste trabalho ajudou a aumentar a identificação das causas de gastroenterite nessa população. A frequência de 3,7% de SaV nas amostras estudadas deve ser somada a frequência de outros vírus entéricos emergentes que parecem ter papel importante para redução do número de casos de gastroenterite sem identificação viral, como os HAstr, AdV e que vem sendo estudados de forma mais intensa nos últimos anos, após implantação da vacina contra rotavírus (Payne et al., 2008).

A vigilância contínua destes patógenos é necessária para monitoramento de seu impacto em Saúde Pública e detecção de novas cepas emergentes, bem como prover mais dados sobre a epidemiologia dos SaV no Brasil. Nossos dados sugerem a necessidade de implantação do diagnóstico de SaV nos programas de monitoramento de diarreia aguda.

## *CONCLUSÕES*

## 7. CONCLUSÕES

1. As técnicas de nested RT-PCR e rRT-PCR foram padronizadas e implantadas para detecção de SaV em amostras de fezes de pacientes com gastroenterites.
2. Nossos dados demonstraram que a metodologia de rRT-PCR apresentou-se mais sensível para detecção dos SaV.
3. Por meio da técnica de clonagem, foi obtido um RNA padrão para SaV (controle positivo).
4. A taxa de detecção de SaV apresentada na população estudada (3,7%) e, a maior frequência de positividade relatada em crianças menores de 2 anos de idade, condiz com os dados encontrados na literatura mundial.
5. Em nosso estudo foi possível detectar 13 surtos de SaV no período de 2010 a 2017 demonstrando a importância da vigilância ativa deste patógeno.
6. A análise filogenética das amostras estudadas apresentou a predominância da circulação de genogrupos comumente encontrados no mundo: GI e GII, bem como, a presença de genótipos incomuns (GI.6, GII.4 e GII.5).
7. O genótipo GII.5 foi descrito pela primeira vez no Brasil.
8. O presente estudo foi o primeiro a realizar a detecção de SaV no estado de São Paulo.
9. A vigilância continua destes patógenos faz-se necessária para monitoramento de seu impacto em Saúde Pública e detecção de novas cepas emergentes.

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 1969; 119: 668-73.

Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Yagyu F, Okitsu S, Muller WE, Ushijima H. Identification of sapovirus infection among Japanese infants in a day care center. *J Med Virol* 2005; 77:595-601.

Dos Anjos K, Lima LM, Silva PA, Inoue-Nagata AK, Nagata T. The possible molecular evolution of sapoviruses by inter- and intra-genogroup recombination. *Arch Virol* 2011; 156(11):1953-59.

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

Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, de Lucena MS, Siqueira JA, Fumian TM, Hernandez Jd, de Oliveira CS, Oliveira Dde S, Araújo Eda C, Soares Lda S, Linhares AC, Gabbay YB. Norovirus diversity in diarrheic children from na Africandescendant settlement in Belém, Northern Brazil. *PLoS One* 2013; 8(2):e56608.

Bank-Wolf BR, Konig M, Thiel HJ. Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses *Vet Microbiol* 2010; 140: 204–12.

Becker-Dreps S, Bucardo F, Vilchez S, Zambrana LE, Liu L, Weber DJ, Peña R, Barclay L, Vinjé J, Hudgens MG, Nordgren J, Svensson L, Morgan

DR, Espinoza F, Paniagua M. Etiology of childhood diarrhea after rotavirus vaccine introduction: a prospective, population-based study in Nicaragua. *Pediatr Infect Dis J* 2014; 33(11):1156-63.

Biscaro V, Piccinelli G, Gargiulo F, et al. Detection and molecular characterization of enteric viruses in children with acute gastroenteritis in Northern Italy. *Infect Genet Evol* 2018; 60:35-41.

Bucardo F, Carlsson B, Nordgren J, Larson G, Blandon P, Vilchez S, Svensson L. Susceptibility of children to sapovirus infections, Nicaragua, 2005-2006. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:1875-78.

Bucardo F, Reyes Y, Svensson L, Nordgren J. Predominance of norovirus and sapovirus in Nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination. *PLoS One* 2014; 9(5):e98201.

Burroughs JN, Brown F. Physico-chemical Evidence for the Re-classification of the Caliciviruses. *J Gen Virol* 1974; 22(2):281-86.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines 2011. *Morb Mortal Wkly Rep* 2011; 60: 1-15.

Chhabra P, Payne DC, Szilagyi PG, Edwards KM, Staat MA, Shirley SH, Wikswo M, Nix WA, Lu X, Parashar UD, Vinjé J. Etiology of viral gastroenteritis in children <5 years of age in the United States, 2008-2009. *J Infect Dis* 2013; 208(5):790-800.

Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T, Fukui S. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol* 1979; 4(4):249-54.

Chiba S, Nakata S, Numata-KInoshita K, Honma S. Sapporo vírus: history and recente findings. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl 2): S303-308.

Cho SR, Yun SJ, Chae SJ, Jung S, Kim JH, Yong KC, Cho EH, Choi W, Lee DY. An Outbreak Associated with Sapovirus GI.3 in an Elementary School in Gyeonggi-do, Korea. *J Korean Med Sci* 2020; 35(34):e281.

Choi HL, Suh CI, Park SW, Jin JY, Cho HG, Paik SY. Whole-Genome Sequencing Analysis of Sapovirus Detected in South Korea. *PLoS One* 2015; 10(7):e0132328.

Cilli A, Luchs A, Leal E, et al. Human sapovirus GI.2 and GI.3 from children with acute gastroenteritis in northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2019; 114:e180574.

Costa LCPDN, Siqueira JAM, Portal TM, et al. Detection and genotyping of human adenovirus and sapovirus in children with acute gastroenteritis in Belém, Pará, between 1990 and 1992: first detection of GI.7 and GV.2 sapoviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2017; 50(5):621-28.

Debbink K, Lindesmith LC, Baric RB. The State of Norovirus Vaccines. *CID* 2014; 58(12):1746-1752.

de Oliveira DMM, Souza M, Fiaccadori FS, Santos HCP, Cardoso DDP. Monitoring of Calicivirus among day-care children: Evidence of asymptomatic viral excretion and first report of GI.7 norovirus and GI.3 sapovirus in Brazil. *J Med Virol* 2014; 86(9):1569-75.

Dewey-Mattia D, Manikonda K, Hall AJ, Wise ME, Crowe SJ. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 2009-2015. *MMWR Surveill Summ* 2018; 67(10):1-11.

Dey SK, Phan TG, Nguyen TA, et al. Prevalence of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh during 2004-2005. *J Med Virol* 2007; 79(5):633-38.

Dey SK, Phathamavong O, Nguyen TD, Thongprachum A, Chan-It W, Okitsu S, et al. Seasonal pattern and genotype distribution of sapovirus infection in Japan, 2003-2009. *Epidemiol Infect* 2012; 140:74-77.

Dey SK, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Novel recombinant sapovirus in Bangladesh. *Clin Lab* 2011; 57(1-2):91-94.

Diez-Valcarce M, Montmayeur A, Tatusoy R, Vinje J. Near complete human sapovirus genome sequences from Kenya. *Microbiol Resour Annonc* 2019; 8(7): e01602-18.

Dolin R, Reichman RC, Roessner KD, et al. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 1982; 146(2):184-189.

Dove W, Cunliffe NA, Gondwe JS, et al. Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol* 2005; 77(4):522-27.

Farkas T, Zhong WM, Jing Y, et al. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol* 2004; 149(7):1309-23.

Farkas T, Deng X, Ruiz-Palacios G, Morrow A, Jiang X. Development of an enzyme immunoassay for detection of sapovirus-specific antibodies and its application in a study of seroprevalence in children. *J Clin Microbiol* 2006; 44(10):3674-79.

Farthing M, Lindberg G, Dite P, Khalif I, Salazar-Lindo E, Ramakrishna BS, Goh K, Thomson A, Khan AG. World Gastroenterology Organisation practice guideline: Acute diarrhea. World Gastroenterology Organisation: Março, 2008.

Farthing M, Salam M, Lindberg G, Dite P, Khalif I, Salazar-Lindo E, Ramakrishna BS, Goh K, Thomson A, Khan AG, Krabshuis J, LeMair A. World Gastroenterology Organization Global Guidelines Acute diarrhea in adults and children: a global perspective. World Gastroenterology Organisation: Fevereiro, 2012.

Fioretti JM, Rocha MS, Fumian TM, et al. Occurrence of human sapoviruses in wastewater and stool samples in Rio De Janeiro, Brazil. J Appl Microbiol 2016; 121(3):855-62.

Flewett TH, Davies H. Caliciviruses in man. Lancet 1976; 1(7954):311.

Firth C, Bhat M, Firth MA, Williams SH, Frye MJ, Simmonds P, et al. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. MBio 2014; 5(5):e01933–14.

Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Lewis D, Cubitt D, Cotterill H, Gray JJ. Characterization of sapoviruses collected in the United Kingdom from 1989 to 2004. J Med Virol 2006; 78(5):673-82.

GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet Infect Dis 2017; 17(9):909-48.

Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, et al. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep* 2005; 6(10):968-972.

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

Gonzalez GG, Liprandi F, Ludert JE. Molecular epidemiology of enteric viruses in children with sporadic gastroenteritis in Valencia, Venezuela. *J Med Virol* 2011; 83: 1972-82.

Grant LR, O'Brien KL, Weatherholtz RC, Reid R, Goklish N, Santosham M, Parashar U, Vinje J. Norovirus and Sapovirus Epidemiology and Strain Characteristics among Navajo and Apache Infants. *PLoS One* 2017; 3:12(1).

Green KY, Ando T, Balayan MS, et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 2000; 181 Suppl 2:S322-S330.

Green KY. Caliciviridae: the noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Fields virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 582-608, 2013.

Guo M, Chang KO, Hardy ME, Zhang Q, Parwani AV, Saif LJ. Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to Sapporo-like human caliciviruses. *J Virol* 1999; 73(11):9625–31.

Guo M, Evermann JF, Saif LJ. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. *Arch Virol* 2001; 146(3):479–93.

Gutiérrez-Escolano AL, Brito ZU, del Angel RM, Jiang X. Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol* 2000; 74(18):8558-62.

Hansman GS, Takeda N, Oka T, Oseto M, Hedlund KO, Katayama K. Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerg Infect Dis* 2005a; 11(12):1916-20.

Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, et al. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerg Infect Dis* 2005b; 11(1):180-82.

Hansman GS, Saito H, Shibata C, Ishizuka S, Oseto M, Oka T, Takeda N. Outbreak of Gastroenteritis Due to Sapovirus. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (4) 1347-1349.

Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, Nakashima R, Shimada Y, et al. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan. *J Med Virol* 2009; 81:1117–27.

Harada S, Oka T, Tokuoka E, Kiyota N, Nishimura K, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Wakita T, Wang Q, Saif LJ, Katayama K. A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. *Arch Virol* 2012; 157(10):1999-2003.

Ishizuka S, Oka T, Tabara K, Omura T, Katayama K, Takeda N, Noda M. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. *J Med Virol* 2010; 82:1247-54.

Iritani N, Kaida A, Abe N, Kubo H, Sekiguchi JI, Yamamoto SP, Goto K, Tanaka T, Noda M. Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka city, Japan. *J Med Virol* 2014; 86: 2019-25.

Iwakiri A, Ganmyo H, Yamamoto S, et al. Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion. *Arch Virol*. 2009; 154(4):689-93.

Jiang X, Wang J, Estes MK. Characterization of SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA. *Arch Virol* 1995; 140(2):363-74.

Johansson PJ, Bergentoft K, Larsson PA, Magnusson G, Widell A, Thorhagen M, Hedlund KO. A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scand J Infect Dis* 2005; 37:200-204.

Johnsen CK, Midgley S, Bottiger B. Genetic diversity of sapovirus infections in Danish children 2005-2007. *J Clin Virol* 2009; 46:265-69.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR. & Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infections nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10: 1075-1081.

Katayama, K.; Miyoshi, T.; Uchino, K.; Oka, T.; Tanaka, T.; Takeda, N.; Hansman, G.S. Novel recombinant sapovirus. *Emerg. Infect Dis* 2004; 10: 1874–1876.

Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Katayama H, Takeda N, Katayama K, Ohgaki S. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(8):2461-7.

Kobayashi S, Fujiwara N, Yasui Y, Yamashita T, Hiramatsu R, Minagawa H. A foodborne outbreak of sapovirus linked to catered box lunches in Japan. *Arch Virol* 2012; 157:1995-97.

Kumthip K, Khamrin P, Ushijima H, Chen L, Li S, Maneekarn N. Genetic recombination and diversity of sapovirus in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand, 2010-2018. *Peer J* 2020; 8:e8520.

Kuroda, M.; Masuda, T.; Ito, M.; Naoi, Y.; Doan, Y.H.; Haga, K.; Tsuchiaka, S.; Kishimoto, M.; Sano, K.; Omatsu, T.; et al. Genetic diversity and intergenogroup recombination events of sapoviruses detected from feces of pigs in Japan. 2017. *Infect Genet. Evol* 2017, 55:209–17.

Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 1993; 259(5094):516-19.

Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga, AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review for the Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. *Plos One* 4 de setembro de 2013.

Lee LE, Cebelinski EA, Fuller C, Keene WE, Smith K, Vinjé J, Besser JM. Sapovirus outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002-2009. *Emerg Infect Dis* 2012; 5:873-6.

Leers WD, Kasupski G, Fralick R, Wartman S, Garcia J, Gary W. Norwalk-like gastroenteritis epidemic in a Toronto hospital. *Am J Public Health* 1987; 77(3):291-95.

Li L, Pesavento PA, Shan T, Leutenegger CM, Wang C, Delwart E. Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses. *J Gen Virol* 2011a; 92(Pt 11):2534–41.

Li L, Shan T, Wang C, Cote C, Kolman J, Onions D, et al. The fecal viral flora of California sea lions. *Journal of Virology* 2011b; 85(19):9909–17.

Li J, Shen Q, Zhang W, Zhao T, Li Y, Jiang J, Yu X, Guo Z, Cui L, Hua X. Genomic organization and recombination analysis of a porcine sapovirus identified from a piglet with diarrhea in China. *Virology* 2017; 14:57.

Lima AAM, Oliveira DB, Quetz JS, et al. Etiology and severity of diarrheal diseases in infants at the semiarid region of Brazil: A case-control study. *PLoS Negl Trop Dis* 2019; 13(2):e0007154.

Liu X, Yamamoto D, Saito M, Imagawa T, Ablola A, Tandoc III AO, Segubre-Mercado E, Lupisan SP, Okamoto M, Furuse Y, Saito M, Oshitani H. Molecular detection and characterization of sapovirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in the Philippines. *J Clin Virol* 2015; 68:83-88.

Liu, X.; Jahuira, H.; Gilman, R.H.; Alva, A.; Cabrera, L.; Okamoto, M.; Xu, H.; Windle, H.J.; Kelleher, D.; Varela, M.; et al. Etiological Role and Repeated Infections of Sapovirus among Children Aged Less than 2 Years in a Cohort Study in a Peri-urban Community of Peru. *J Clin. Microbiol* 2016; 154: 1598–1604.

Lyman WH, Walsh JF, Kotch JB, Wbwe DJ, Gunn E, Vinje J. Prospective study of etiologic agents of acute gastroenteritis in child care centers. *J Pediatr* 2009; 154: 253-57.

Madeley CR, Cosgrove BP. Caliciviruses in man. *Lancet* 1976; 7952:199-200, v. 307.

Magwalivha M, Kabue JP, Traore AN, Potgieter N. Prevalence of human sapovirus in low and middle income countries. *Advances in Virology* 2018:5986549.

Makhaola K, Moyo S, Kebaabetswe LP. Distribution and Genetic Variability of Sapoviruses in Africa. *Viruses* 2020; 12(5):490.

Mann P, Pietsch C, Liebert UG. Genetic Diversity of Sapoviruses among Inpatients in Germany, 2008-2018. *Viruses* 2019; 11(8):726.

Mans J, Murray TY, Kiulia NM, Mwenda JM, Musoke RN, Taylor MB. Human caliciviruses detected in HIV-seropositive children in Kenya. *J Med Virol* 2014; 86:75–81

Matussek A, Dienus O, Djeneba O, Simpore J, Nitiema L, Nordgren J, Molecular characterization and genetic susceptibility of sapovirus in children with diarrhea in Burkina Faso. *Infect Genet Evol* 2015; 32:396-400.

Miyazaki N, Taylor DW, Hansman GS, Murata K. Antigenic and Cryo-Electron Microscopy Structure Analysis of a Chimeric Sapovirus Capsid. *J Virol* 2015; 90(5):2664-2675.

Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Volume 1. 1 ed. Brasil, 2017.

Mombo IM, Berthet N, Bouchier C, Fair JN, Schneider BS, Renaud F, et al. Characterization of a genogroup I sapovirus isolated from chimpanzees in the republic of congo. *Genome Announc.* 2014 ;2(4) e00680-14.

Murray TY, Nadan S, Page NA, Taylor MB. Diverse sapovirus genotypes identified in children hospitalised with gastroenteritis in selected regions of South Africa. *J Clin Virol* 2016; 76:24-29.

Nakamura K, Saga Y, Iwai M, Obara M, Horimoto E, Hasegawa S, Kurata T, Okumura H, Nagoshi M, Takizawa T. Frequent detection of noroviruses and sapoviruses in swine and high genetic diversity of porcine

sapovirus in Japan during Fiscal Year 2008. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(4):1215-22.

Nakata S, Chiba S, Terashima H, Yokoyama T, Nakao T. Humoral immunity in infants with gastroenteritis caused by human calicivirus. *J Infect Dis* 1985; 152:274-79.

Nakata S, Honma S, Numata K, Kogawa K, Ukae S, Adachi N, Jiang X, Estes MK, Gatheru Z, Tukei PM, Chiba S. Prevalence of human calicivirus infections in Kenya as determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3160-63.

Nakata S, Honma S, Numata KK, Kogawa K, Ukae S, Morita Y, Adachi N, Chiba S. Members of the family caliciviridae (Norwalk virus and Sapporo virus) are the most prevalent cause of gastroenteritis outbreaks among infants in Japan. *J Infect Dis* 2000; 181:2029-32.

Nguyen TA, Hoang L, Pham le D, et al. Norovirus and sapovirus infections among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City during 2005-2006. *J Trop Pediatr.* 2008;54(2):102-13.

Niwa S, Tsukagoshi H, Ishioka T, Sasaki Y, Yoshizumi M, Morita Y, Kimura H, Kozawa K. Triplex real-time polymerase chain reaction assay for detection and quantification of norovirus (GI and GII) and sapovirus. *Microbiol Immunol* 2014; 58(1):68-71.

Numata K, Hardy ME, Nakata S, Chiba S, Estes MK. Molecular characterization of morphologically typical human calicivirus Sapporo. *Arch Virol* 1997; 142:1537-52.

Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, White PA, Takeda N. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2006; 78:1347-53.

Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28:32-53.

Oka, T.; Lu, Z.; Phan, T.; Delwart, E.L.; Saif, L.J.; Wang, Q. Genetic Characterization and Classification of Human and Animal Sapoviruses.. *PLoS ONE* 2016; 11, e0156373.

Oka T, Doan YH, Haga K, Mori K, Ogawa T, Yamazaki A. Genetic Characterization of Rare Genotype GII.5 Sapovirus Strain Detected from a Suspected Food-Borne Gastroenteritis Outbreak among Adults in Japan in 2010. *Jpn J Infect Dis* 2017 24;70(2):223-224.

Oka T, Stoltzfus GT, Zhu C, Jung K, Wang Q, Saif LJ. Attempts to grow human noroviruses, a sapovirus, and a bovine norovirus in vitro. *PLoS One* 2018; 13(2):e0178157.

Oka T, Iritani N, Yamamoto SP, Mori K, Ogawa T, Tatsumi C, Shibata S, Harada S, Wu FT. Broadly recative real-time reverse transcrip-tion-polymerase chain reation assay for the detection of human sapovirus genotypes. *J Med Virol* 2019; 91:370-377.

Okada M, Shinozaki K, Ogawa T, Kaiho I. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch Virol* 2002; 147:1445-1451.

Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Shinozaki K. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. *Arch Virol* 2006; Dec:151(12):2503-9.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Diarrhoeal disease. Maio, 2017.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Rotavirus vaccines: an update. *Wkly Epidemiol Rec.* 2009; 84(50):533-40.

Page N, Groome MJ, Murray T, et al. Sapovirus prevalence in children less than five years of age hospitalised for diarrhoeal disease in South Africa, 2009-2013. *J Clin Virol* 2016; 78:82-88.

Pang XL, Lee BE, Tyrrell GJ, Preiksaitis JK. Epidemiology and genotype analysis of sapovirus associated with gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2004-2007. *J Infect Dis* 2009; 199(4):547-551.

Parashar UD, Burton A, Lanata C, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Steele D, Birmingham M, Glass RI. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J Infect Dis.* 2009; 200 Suppl 1:S9-S15.

Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol* 2009; 44(1):1-8.

Payne DC, Vinje J, Szilagyi PG, et al. Norovirus is a major cause of severe gastroenteritis among US children in the post-rotavirus vaccine era. *N Engl J Med* 2012; 368:1121-30.

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

Phan TG, Okame M, Nguyen TA, et al. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. *J Med Virol* 2004; 73(2):256-61.

Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, et al. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan during 2004-2005. *J Med Virol* 2006; 78(6):839-46.

Portal TM, Siqueira JA, Costa LC, Lima IC, Lucena MS, Bandeira Rda S, Linhares Ada C, Luz CR, Gabbay YB, Resque HR. Caliciviruses in hospitalized children, São Luís, Maranhão, 1997-1999: detection of norovirus GII.12. *Braz J Microbiol* 2016; 47(3):724-30.

Rasanen S, Lappalainen S, Kaikkonen S, Hamalainen M, Saminen M, Vesikari T. Mixed viral infections causing acute gastroenteritis in children in a waterborne outbreak. *Epidemiol Infect* 2010; 138:1227-34.

Ren Z, Kong Y, Wang J, Wang Q, Huang A, Xu H. Etiological study of enteric viruses and the genetic diversity of norovirus, sapovirus, adenovirus, and astrovirus in children with diarrhea in Chongqing, China. *BMC Infect Dis* 2013; 13:412.

Reuter G, Zimsek-Mijovski J, Poljsak-Prijatelj M, et al. Incidence, diversity, and molecular epidemiology of sapoviruses in swine across Europe. *J Clin Microbiol* 2010; 48(2):363-368.

Reymão TK, Hernandez JD, Costa ST, et al. Sapoviruses in children with acute gastroenteritis from Manaus, amazon region, brazil, 2010-2011. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2016; 58:81.

Robinson S, Clarke IN, Vipond IB, Caul EO, Lambden. Epidemiology of human Sapporo-like caliciviruses in the South West of England: molecular characterisation of a genetically distinct isolate. *J Med Virol* 2002; 67:282-88.

Rousset S, Gauthier M, Huynh A, Mansuy JM. Sapovirus-Associated Severe, Prolonged Diarrhoea in an Autologous Stem-Cell Transplant Patient: Case Report and Literature Review. *J Emerg Dis and Virol*: 2018, vol 4.

Sakai Y, Nakata S, Honma S, Tatsumi M, Numata-Kinoshita K, Chiba S. Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *Pediatric Infect Dis J* 2001; 20:849-53.

Sambrook, J e Russell, DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3<sup>a</sup> ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Pr; 2001.

Sánchez GJ, Mayta H, Pajuelo MJ, neira K, Xiaofang L, Cabrera L, Ballard SB, Crabtree JE, Kelleher D, Cama V, Bern C, Oshitani H, Gilman RH, Saito M. Epidemiology of sapovirus infections in a birth cohort in Peru. *Clin Infect Dis* 2018; 66(12):1858-63.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(12): 5463-67.

Sano D, Pérez-Sautu U, Guix S, et al. Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(3):1111-14.

Shen H, Zhang J, Li Y, et al. The 12 Gastrointestinal Pathogens Spectrum of Acute Infectious Diarrhea in a Sentinel Hospital, Shenzhen, China. *Front Microbiol* 2016; 7:1926.

Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. 2007. *Arch Virol* 152: 457-61.

Straub TM, Höner zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, Valdez CO, Bruckner-Lea CJ, Gerba CP, Abbaszadegan M, Nickerson CA. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(3):396-403.

Svraka S, Vennema H, van der Veer B, Hedlund KO, Thorhagen M, Siebenga J, Duizer E, Koopmans M. Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe. *J Clin Microbiol* 2010; 48(6):2191-98.

Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, et al. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* 2006; 80:7816–31.

Tam CC, O'Brien SJ, Tompkins DS, Bolton FJ, Berry L, Dodds J, Choudhury D, Halstead F, Iturriza-Gomara M, Mather K, Rait G, Ridge A, Rodrigues LC, Wain J, Wood B, Gray JJ, e Comitê Executivo de Estudo IID2. Changes in Causes of Acute Gastroenteritis in the United Kingdom Over 15 Years: Microbiologic Findings From 2 Prospective, Population-Based Studies of Infectious Intestinal Disease. *Clin Infect Dis* 2012; 54(9):1275–86.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007; 24(8):1596-99.

Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, Le Pendu J, Calderon RL. Norwalk virus: how infectious is it. *J Med Virol* 2008; 80: 1469-1476.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(22):4673-80.

Timenetsky MCS, Kisielius JJ, Grisi SJ, Escobar AMU, Ueda M, Tanaka H. Rotavírus, Adenovírus, Astrovírus, Calicivírus e “Small Round Virus particles” em fezes de crianças, com e sem diarreia aguda, no período de 1987 a 1988, na grande São Paulo. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1993; 35: 275-280.

Tohma K, Kulka M, Coughlan S, Green KY, Parra GI. Genomic Analyses of Human Sapoviruses Detected over a 40-Year Period Reveal Disparate Patterns of Evolution among Genotypes and Genome Regions. *Viruses* 2020; 12(5):516.

Torner, N.; Martinez, A.; Broner, S.; Moreno, A.; Camps, N.; Dominguez, A. Working Group for the Study of Acute Viral Gastroenteritis Outbreaks in, C. *Epidemiology of Acute Gastroenteritis Outbreaks Caused by Human Calicivirus (Norovirus and Sapovirus) in Catalonia: A Two Year Prospective Study, 2010–2011*. 2016. *PLoS ONE*: 11, e0152503.

Troeger H, Loddenkemper C, Schneider T, et al. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut* 2008; 58:1070–77.

Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, Ando T, Glass RI, Monroe SS. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *Clin Microbiol* 2006; 44(4):1405-12.

Tse H, Chan WM, Li KS, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. Discovery and genomic characterization of a novel bat sapovirus with unusual genomic features and phylogenetic position. *PLoS One* 2012; 7(4):e34987.

Tsinda KE, Malasao R, Furuse Y, et al. Complete coding genome sequences of uncommon GII.8 sapovirus strains identified in diarrhea samples collected from Peruvian children. *Genome Announc* 2017; 5(43):e01137-17.

Varela, M.F.; Rivadulla, E.; Lema, A.; Romalde, J.L. Human Sapovirus among Outpatients with Acute Gastroenteritis in Spain: A One-Year Study. 2019. *Viruses*: 11, 144.

Wang Q, Zhang Z, Saif LJ. Stability of and attachment to lettuce by a culturable porcine sapovirus surrogate for human caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(11):3932-40.

Wang G, Shen Z, Qian F, Li Y, Yuan Z, Zhang J. Genetic diversity of sapovirus in non-hospitalized adults with sporadic cases of acute gastroenteritis in Shanghai, China. *J Clin Virol* 2014; 59:250-254.

World Gastroenterology Organization Global Guideline Diarrhea aguda em adultos e crianças: uma perspectiva mundial. Reino Unido, 2012.

Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, et al. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis* 1974; 129(6):709-14.

Wu FT, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo CH, Liang SY, Hung CH, Dah-Shyong Jiang D, Hsin Chang J, Yang JY, Wu HS, Yang CF. Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008 Jul;14(7):1169-71.

Xavier MPTP, Oliveira SA, Ferreira MSR, Victoria M, Miranda V, Silva MFM et al. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42:(5) 438-444.

Xue L, Cai W, Zhang L, et al. Prevalence and genetic diversity of human sapovirus associated with sporadic acute gastroenteritis in South China from 2013 to 2017. *J Med Virol* 2019; 91(10):1759-64.

Yoneda M, Nakano M, Sugimoto D, Inada M, Fujitani M, Kitahori Y. Epidemiological Characteristics of Sapovirus and Human Astrovirus Detected among Children in Nara Prefecture, Japan, during the 2009/2010-2014/2015 Seasons. *Jpn J Infect Dis* 2017; 70(1):87-91.

Yoshida T, Kasuo S, Azegami Y, et al. Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. *J Clin Virol* 2009; 45(1):67-71.

Zahorsky J. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr* 1929; 46:391-395.

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE SAPOVÍRUS EM AMOSTRAS DE FEZES DE PACIENTES COM GASTROENTERITE

**Pesquisador:** MARIA DO CARMO SAMPAIO TAVARES TIMENETSKY

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 55275516.0.0000.0059

**Instituição Proponente:** Instituto Adolfo Lutz

**Patrocinador Principal:** Instituto Adolfo Lutz

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.826.255

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo retrospectivo utilizando amostras fecais provenientes de várias regiões do Brasil pertencentes a Vigilância Nacional das Gastroenterites do Ministério da Saúde e da rotina do Programa de Monitoramento das Doenças Diarreicas Agudas (PMDDA) do Núcleo de Doenças Entéricas (NDE) do Centro de Virologia do IAL.

O objetivo do projeto trata-se da identificação de Sapovírus (SV) em amostras negativas para Rotavírus, Astrovírus, Adenovírus entérico e Norovírus. Entretanto, o projeto inicial utilizaria amostras armazenadas no período de 2000 a 2015.

A emenda foi apresentada para solicitar mudança no título do projeto e ampliação do período de estudo para utilização de amostras referentes aos anos de 2016 e 2017, sem nenhuma modificação dos objetivos.

**Objetivo da Pesquisa:**

- Objetivo Primário

Identificação de SV em amostras de fezes de pacientes com gastroenterites como diagnóstico diferencial para surtos e casos esporádicos de diarreia aguda com suspeita viral negativos para outros vírus entéricos.

- Objetivos Secundários

**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

**Bairro:** Cerqueira César

**CEP:** 01.246-902

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3068-2859

**Fax:** (11)3085-3505

**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.826.255

Padronizar o ensaio de RT-PCR convencional para diagnóstico dos SV; padronizar o ensaio de rRT-PCR para diagnóstico dos SV; determinar os genótipos circulantes nas regiões estudadas pelo sequenciamento dos SV detectados; realizar estudo filogenético do SV; implantar o diagnóstico dos SV no monitoramento laboratorial das gastroenterites no NDE-IAL; estudar casos de SV em surtos e casos esporádicos em crianças e adultos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos**

Embora a pesquisadora relate no projeto que não há risco para o paciente, foi solicitado na relatoria do projeto inicial a apresentação de consideração a respeito dos riscos mínimos.

Foi apresentada ao CEPIAL uma carta em que a pesquisadora esclarece que há riscos mínimos em relação ao uso de dados secundários do paciente, e que os pesquisadores envolvidos comprometem-se a manter o sigilo das informações individuais dos pacientes.

**Benefícios**

Incluir o diagnóstico de SV no PMDDA auxiliando nos Serviços de Vigilância Epidemiológica para as doenças diarreicas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo é de grande relevância em Saúde Pública, pois possibilitará o diagnóstico diferencial dos SV, visto serem importantes agentes causadores de gastroenterites em humanos. Assim, esse estudo contribuirá para o conhecimento da incidência, diversidade e monitoramento dos SV em determinadas regiões do Brasil em relação a outros países.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- Está apresentada a Folha de rosto referente ao projeto inicial: "Diagnóstico diferencial de Sapovírus em amostras de fezes de pacientes com gastroenterites no período de 2000 a 2015"(15/04/2016). No documento PB informações básicas do projeto foi feita a alteração do título: ""Diagnóstico diferencial de Sapovírus em amostras de fezes de pacientes com gastroenterite" (26/06/2018).
- Aprovação do CTC/IAL atual, relacionada a mudança de título do projeto: CTC 47-H/2015 de 28/05/2018.
- Termo de responsabilidade e sigilo assinado pela pesquisadora responsável.
- Foi apresentada Carta, assinada pela pesquisadora responsável, de 26/06/2018, solicitando alteração no título "Diagnóstico diferencial de Sapovírus em amostras de fezes de pacientes com

**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

**Bairro:** Cerqueira César

**CEP:** 01.246-902

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3068-2859

**Fax:** (11)3085-3505

**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.826.255

gastroenterites no período de 2000 a 2015” para “Diagnóstico diferencial de Sapovírus em amostras de fezes de pacientes com gastroenterite” e, também, ampliação do período de estudo para utilização de amostras do ano de 2016 e 2017.

A justificativa para essas mudanças é dada da seguinte forma: “Durante a etapa de monitoramento retrospectivo, evidenciou-se a necessidade de ampliação do período de estudo visando atualizar os resultados obtidos. Ainda, a taxa de positividade identificada até o momento está abaixo da esperada de acordo com a literatura vigente, reforçando a necessidade de ampliação do período de estudo, de modo a diminuir o viés que possa ser encontrado”.

- Foi apresentado também o relatório parcial do projeto de pesquisa, sendo descrito em cronograma as atividades concluídas, em andamento e a situação da etapa atual da pesquisa.

**Recomendações:**

Nada a declarar.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Protocolo de pesquisa aprovado e coerente com as normas institucionais.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL na reunião ordinária de 16 de agosto de 2018.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

XI - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção

**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

**Bairro:** Cerqueira César

**CEP:** 01.246-902

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3068-2859

**Fax:** (11)3085-3505

**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.826.255

do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                            | Arquivo                               | Postagem               | Autor                 | Situação |
|---|---------------------------------------|------------------------|-----------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1160937_E1.pdf | 26/06/2018<br>14:47:41 |                       | Aceito   |
| Outros                                    | Relatorio_parcial_etica.pdf           | 26/06/2018<br>14:36:45 | Audrey Cilli Chirelli | Aceito   |
| Outros                                    | Carta_cepial_2018.pdf                 | 26/06/2018<br>14:35:26 | Audrey Cilli Chirelli | Aceito   |
| Outros                                    | aprovacao_CTC_2018.pdf                | 26/06/2018<br>14:34:59 | Audrey Cilli Chirelli | Aceito   |
| Outros                                    | Termo_responsabilidade_2018.pdf       | 26/06/2018<br>14:34:37 | Audrey Cilli Chirelli | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Doutorado_Sapovirus_2018.pdf  | 26/06/2018<br>14:34:14 | Audrey Cilli Chirelli | Aceito   |
| Folha de Rosto                            | FOLHA_DE_ROSTO.pdf                    | 15/04/2016<br>09:44:51 | Audrey Cilli Chirelli | Aceito   |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 16 de Agosto de 2018

---

**Assinado por:  
Luz Marina Trujillo  
(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

**Bairro:** Cerqueira César

**CEP:** 01.246-902

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3068-2859

**Fax:** (11)3085-3505

**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br