



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EVERSON DOS SANTOS DAVID

**A aplicação da metagenômica na detecção de vírus entéricos
em comunidades ribeirinhas do Município de Santana, Amapá,
Amazônia Oriental.**

Macapá
2021

EVERSON DOS SANTOS DAVID

**A aplicação da metagenômica na detecção de vírus entéricos
em comunidades ribeirinhas do Município de Santana,
Amapá, Amazônia Oriental.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto
Co-orientadora: Dra. Shirley Vasconcelos Komninakis

**Macapá
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Jamile da Conceição da Silva – CRB-2/1010

-
- D251a David, Everson dos Santos.
A aplicação da metagenômica na detecção de vírus entéricos em comunidades ribeirinhas do município de Santana, Amapá, Amazônia Oriental. / Everson dos Santos David. - 2021.
1 recurso eletrônico. 86 f : ilustradas.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Orientador: Professor Doutor Raimundo Nonato Picanço Souto
Coorientadora: Professora Doutora Shirley Vasconcelos Komninakis

Modo de acesso: World Wide Web.
Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

Inclui referências, anexos e apêndices.

1. Diarreia em crianças. 2. Vírus. 3. Metagenôma viral. I. Souto, Raimundo Nonato Picanço, orientador. II. Komninakis, Shirley Vasconcelos, coorientadora. III. Título.

Classificação Decimal de Dewey. 22 ed. 618.9233

DAVID, Everson dos Santos. **A aplicação da metagenômica na detecção de vírus entéricos em comunidades ribeirinhas do município de Santana, Amapá, Amazônia Oriental.** Orientador: Raimundo nonatos Picanço Souto. Coorientadora: Shirley Vasconcelos Komninakis. 2021. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá
BANCA EXAMINADORA**

Aluno: Everson dos Santos David

Orientador: Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto

Co-Orientadora: Dra. Shirley Vasconcelos Komninakis

Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto / Presidente

Professor Titular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amapá,
UNIFAP.

Prof. Dr. Rafael Lima Resque / Membro Titular

Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

Prof^a. Dr^a. Cecilia Salete Alencar / Membro Titular

Pesquisadora do Laboratório de Medicina Laboratorial / Departamento de Patologia,
Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, USP.

Data:29/10/2021

***Dedico este trabalho a minha mãe Irenilda Duarte e
em memória de minha avó Helena Duarte.***

AGRADECIMENTOS

O Primeiro Motor ou Motor Imóvel é responsável pelo princípio do movimento dado na causa eficiente ou final. O Motor é o que move sem ser movido. Agradeço primeiramente a Deus, principio e inicio de todas as coisas.

À minha mãe Irenilda Duarte, pela dedicação, apoio incondicional em não medir esforços para a criação e educação dos filhos.

À minha avó Helena Duarte, pelo carinho, amor e paciência em todos os momentos de minha vida, por todo sua dedicação, e pelo seu imenso amor com a família.

Às minhas irmãs e irmãos que dividem comigo todo o esforço de luta continuamente pelos sonhos através dos estudos e trabalho.

Às Pequenas Apostolas da Caridade, em especial a minha grande amiga Antonieta, que sempre me apoiaram ao longo de toda a graduação, e nos momentos mais adversos da minha vida, agradeço pela paciência, incentivo e ajuda.

Ao Bem Aventurado Luiz Monza, graças a sua obra eu conheci as Pequenas Apostolas da Caridade, e a quem peço intercessão.

Ao meu orientador Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto, pelo acolhimento em seu laboratório, aceitação de orientação deste trabalho, mesmo sabendo das minhas dificuldade, por suas orientações valiosas, por não ter desistido de mim e do meu trabalho.

À minha Co-Orientadora Dra. Shirley Vasconcelos Komninakis, por todo apoio que recebi durante o mestrado, não me deixou faltar nada a nível de conhecimento, pelo acolhimento no laboratório de Retrovirologia em São Paulo, por ter me proporcionado esta boa experiência.

Ao laboratório de Arthropoda da Universidade Federal do Amapá - UNIFAP, principalmente a técnica de laboratório Karen e todo o grupo de pesquisa.

Ao Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, principalmente aos Doutorandos Robson e Rodrigo que assessoraram e conduziram todo os procedimentos de metagenômica viral.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, que proporcionou a construção deste conhecimento, na oferta de disciplinas que buscavam integrar o discente no ambiente acadêmico.

À Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, pela infraestrutura disponibilizada para aquisição de desenvolvimento de minhas habilidades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela disponibilização de uma bolsa que proporcionou manter minhas atividades no decorrer do mestrado.

À minha colega de mestrado que se transformou amiga, Anne Caroline por todo o apoio no decorrer desta jornada, nas frustrações e alegrias, sempre dando apoio.

A minha amiga Gabriela Amanajás, por todo o apoio durante o mestrado, sua amizade deixou a jornada mais suave.

Ao meu amigo, irmão de fé, fera da biologia, e mestrando em Ciências da saúde, Erique Fonseca, pela alegria e companheirismo nos momentos mais difíceis, confiante, sempre me ajuda nos momentos mais complicados, que juntamente com minha amiga Marília estão sempre próximo apoiando em todas as minhas decisões.

As amigas que fiz no mestrado, a Franciane e a Yasmim, pelas trocas de ideias e dúvidas. E a Ana que conseguiu gelox para o transporte das amostras.

A minha amiga Marlúcia que me ajudou no transporte das amostras para São Paulo.

À Dona Maria, minha amiga Ticiane, Geovana, Mateus, Erica Lima que me ajudaram nas coletas.

Por fim agradeço a todos os pacientes voluntários deste estudo, e a todos que contribuíram direta e indiretamente na elaboração deste trabalho.

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	1.1 ASPECTOS CLÍNICOS DA DIARREIA.....	2
1.2	A OCORRÊNCIA DA DIARREIA AGUDA NO MUNDO E NO BRASIL.....	4
1.3	ETIOLOGIA VIRAL.....	8
1.3.1	Astrovírus.....	10
1.3.2	Calicivirus.....	11
1.3.3	Adenovírus entérico.....	12
1.3.4	Norwalk.....	13
1.3.5	Rotavírus.....	14
1.4	ESTUDOS EM METAGENÔMICA VIRAL.....	16
1.5	BIOINFORMÁTICA.....	18
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	PACIENTES E ASPECTOS ÉTICOS.....	20
3.2	COLETA DO MATERIAL FECAL E DADOS DEMOGRÁFICOS.....	20
3.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	21
3.4	EXTRAÇÃO DO DNA/ RNA.....	21
3.5	PREPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS.....	21
3.6	ANÁLISES DOS DADOS.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1	CARACTERIZAÇÃO SOCIOECONÔMICO, DEMOGRÁFICO, AMBIENTAL E CULTURAL DOS PACIENTES.....	27
4.2	DIVERSIDADE VIRAL.....	32
4.3	DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS.....	38
4.3.1	Astroviridae.....	39
4.3.2	Caliciviridae.....	40
4.3.3	Picornaviridae.....	41
4.4	DETECÇÃO DE OUTROS VÍRUS.....	42

4.4.1	Vírus patogênicos em Humanos.....	42
4.4.2	Vírus de animais.....	43
4.4.3	Vírus de Plantas e Algas.....	44
4.4.4	Vírus que infectam Protozoários (Ameba).....	45
4.4.5	Deteção de vírus de DNA sem classificação.....	45
4.4.6	Bacteriófagos.....	46
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	ANEXOS E APÊNDICES.....	64
	Parecer do Comitê de Ética	64
	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	71
	Normas de publicação dos respectivos periódicos	73
	Outros anexos específicos da pesquisa	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Indicadores de saúde para doenças infectoparasitárias (DIP) e doenças relacionadas à poluição hídrica.	6
Tabela 2 -	Perfil socioeconômico, demográfico, ambiental e cultural por localidade.	28
Tabela 3 -	As famílias virais e o número de sequências divididas por ocorrência nas quatro localidades.	35
Tabela 4 -	Amostras e localidades, onde foram detectadas diferentes espécies de vírus entéricos e o número de sequências.	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Agentes etiológicos causadores da diarreia.	3
Quadro 2 -	Formas de transmissão dos vírus.	8
Quadro 3 -	Principais vírus envolvidos nas doenças diarreicas agudas.	9
Quadro 4 -	As manifestações clínicas dos principais vírus envolvidos nas doenças diarreicas agudas.	9

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Agentes etiológicos da diarreia em países desenvolvidos e em desenvolvimento.	10
Figura 2 -	Representação esquemática do astrovírus humano.	11
Figura 3 -	Estrutura dos Calicivirus.	12
Figura 4 -	Estrutura esquemática de uma partícula de adenovírus entérico.	13
Figura 5 -	Morfologia de norovírus. A) visualização em microscópio eletrônico. B) estrutura morfológica desenvolvida em programas computacionais.	14
Figura 6 -	A partícula do rotavírus. A) Micrografia eletrônica de partículas de rotavírus. B) Esquema em corte transversal da partícula de rotavírus.	15
Figura 7 -	Esquema mostrando a etapa de tagmentação do kit Nextera XT.	22
Figura 8 -	Representação da preparação da placa para distribuição dos indexes.	23
Figura 9 -	Adição dos index e sequências adaptadoras ao DNA.	24
Figura 10 -	Organização dos index e sequências adaptadoras.	24
Figura 11 -	Distribuição dos números de questionários aplicados por localidade.	27
Figura 12 -	Número de leituras de sequências divididas entre as quatro comunidades em estudo.	33
Figura 13 -	A porcentagem de sequências de todas as 50 bibliotecas categorizadas quanto ao seu hospedeiro.	34
Figura 14 -	Representação gráfica das 20 famílias detectadas por similaridade no <i>Genbank</i> , percentual dividido nas quatro comunidades.	36

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
OMS	Organização Mundial da Saúde
NGS	Sequenciamento de Segunda Geração
DDA	Doença Diarreica Aguda
g	Gramas
spp.	Abreviatura de espécies
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
ONU	Organização das Nações Unidas
ODM	Objetivo de Desenvolvimento do Milênio
DIP	Indicadores de saúde para doenças infectoparasitárias
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
SINAN	Sistema de Informação e Agravos de Notificação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
nm	Nanômetro
kb	Quilobases
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgM	Imunoglobulina da classe M
VLPs	Partículas virais do vírus Norwalk
µm	Micrómetro
Gb	Gigabyte
pb	Pares de base

≥	Maior ou igual a
NCBI	National Center for Biotechnology Information
AP	Estado do Amapá
UBS	Unidades Basicas de Saúde
km	Quilômetro
°C	Grau (s) Celsius
UNIFAP	Universidade Federal de Amapá
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
mL	Mililitro
PBS	Salina tamponada com fosfato
uL	Microlitro
cDNA	DNA complementar
EUA	Estados Unidos da América
MA	Estado de Massachusetts
CA	Estado de Califórnia
WI	Estado de Wisconsin
TDB	<i>Buffer Tagmentation DNA</i>
NT	<i>Neutralize Tagment</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RPM	Rotações por minuto
NaOH	Hidróxido de Sódio
N	Newton
PAL	<i>Pooled Amplicon Library</i>
UCSF	Universidade da Califórnia
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
RefSeq	Base de dados referência do NCBI
CAESA	Companhia de água e esgoto do Amapá

EIA	Imunoensaios Enzimáticos de Rotina
HAstV	Astrovírus humanos
ICTV	Comitê internacional para a Taxonomia de Vírus
HSaVs	Sapovírus
SaV-A1	<i>Salivírus A1</i>
SaV-A2	<i>Salivírus A2</i>
HCV	Hepatite C
CRESS	Pequenos genomas circulares de DNA de cadeia simples que codificam a proteína Rep

A aplicação da metagenômica na detecção de vírus entéricos em comunidades ribeirinhas do Município de Santana, Amapá, Amazônia Oriental.

RESUMO

Introdução: A incidência da diarreia aguda permanece sendo um grave problema de saúde pública no mundo, principalmente em países em desenvolvimento onde o impacto da doença na população afeta o desenvolvimento infantil, sendo a segunda causa de morte entre crianças menores de cinco anos. Apesar do surgimento de vacinas os casos de diarreia continuam persistentes nas populações pobres. Geralmente, muitos casos de surtos de diarreia continuam sem uma definição do seu agente etiológico, provavelmente trata-se de agentes infecciosos ainda não identificados por métodos tradicionais, dificultando diagnósticos claros e nas estratégias epidemiológicas que promovam ações de prevenção a partir do conhecimentos destes agentes. Neste sentido, a aplicação da metagenômica viral contribui para a detecção de vírus entéricos, na identificação de novos vírus, na vigilância de vírus emergentes e na compreensão do viroma gastrointestinal humano. **Objetivo:** Nesta perspectiva, o objetivo deste trabalho foi Identificar vírus entéricos em amostras fecais de pacientes residentes de comunidades ribeirinhas do município de Santana, Amapá, Amazônia Oriental. **Metodologia:** Foram coletadas 50 amostras fecais de pacientes que buscavam atendimento médico em quatro Unidades Básica de Saúde - UBS de distintas comunidades ribeirinhas seguindo um rigor ético, e um protocolo preciso para a armazenagem e transporte das amostras, de forma de manter - se os vírus ativos. Em laboratório, as amostras foram submetidas a purificação, extração e amplificação do DNA e RNA, na preparação das bibliotecas de metagenômica viral, sequenciamento, e na análise de dados por bioinformática. **Resultados e discussões:** Foram detectadas 227.502 leituras de sequências analisadas e identificadas, relacionadas a 20 famílias virais. Apenas três famílias estão diretamente relacionadas com a ocorrência de diarreia e foram detectadas nas amostras de três crianças menores de dois anos: As famílias *Astroviridae*, *Caliciviridae* e *Picornaviridae*. Outros vírus que causam infecções em humanos foram identificados, porém ainda é desconhecida a sua relação gastrointestinal. **Conclusões:** Neste contexto, este estudo contribui diretamente para a compreensão do viroma humano, a técnica metagenômica viral se demonstra sensível e eficaz na definição dos surtos de diarreia, permitindo associar adequadamente com seus agentes etiológicos.

Palavras-Chave: Vírus; Diarreia; Metagenôma viral.

Agradecimentos: CAPES.

The application of metagenomics in the detection of enteric viruses in riverside communities in the Municipality of Santana, Amapá, Eastern Amazon.

Introduction: The incidence of acute diarrhea remains a serious public health problem worldwide, especially in developing countries where the impact of the disease on the population affects child development, being the second leading cause of death among children under five years of age. Despite the emergence of vaccines, cases of diarrhea remain persistent in poor populations. Generally, many cases of diarrheal outbreaks still do not have a definition of their etiological agent, probably they are infectious agents not yet identified by traditional methods, making clear diagnoses and epidemiological strategies that promote preventive actions based on the knowledge of these agents difficult. In this sense, the application of viral metagenomics contributes to the detection of enteric viruses, the identification of new viruses, the surveillance of emerging viruses and the understanding of the human gastrointestinal viroma. **Objectives:** In this perspective, the aim of this study was to identify enteric viruses in fecal samples from patients residing in riverine communities in the municipality of Santana, Amapá, Eastern Amazon. **Methodology:** Fifty fecal samples were collected from patients seeking medical care in four Basic Health Units - UBS in different riverside communities, following an ethical strictness and a precise protocol for the storage and transport of the samples, in order to keep the virus active. In the laboratory, the samples were subjected to purification, extraction and amplification of DNA and RNA, in the preparation of viral metagenomic libraries, sequencing, and data analysis by bioinformatics. **Results and discussions:** 227,502 readings of analyzed and identified sequences were detected, related to 20 viral families. Only three families are directly related to the occurrence of diarrhea and were detected in samples of three children under two years old: the *Astroviridae*, *Caliciviridae* and *Picornaviridae* families. Other viruses that cause infections in humans have been identified, but their gastrointestinal relationship is still unknown. **Conclusions:** In this context, this study directly contributes to the understanding of the human viroma, the viral metagenomic technique proves to be sensitive and effective in defining diarrhea outbreaks, allowing it to be properly associated with its etiological agents.

Key words: Virus; Diarrhea; Viral metagenome.

Acknowledgement: CAPES.

No Brasil, a ocorrência da diarreia aguda permanece sendo um sério problema de saúde pública, que está relacionado diretamente com a ausência de saneamento básico, e afeta principalmente a população mais pobre, desprovida de recursos hídricos de qualidade e de condições sanitárias adequadas, acometida clinicamente por agentes etiológicos como bactérias, protozoários e vírus.

Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), os fatores ambientais são responsáveis por 5,4% das doenças diarreicas e apresenta correlação com a falta de saneamento básico e, o aumento das taxas de morbidade e mortalidade por doenças infecciosas, representa um grave problema de saúde pública, afetando principalmente, crianças de países em desenvolvimento. O saneamento básico é fundamental no controle da disseminação de vírus patológicos no ambiente, diminuindo os riscos de transmissão (PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014).

Neste contexto, a situação estrutural de serviços básicos na Região Norte encontra-se em calamidade, sendo perceptível que as condições socioeconômicas e sanitárias propiciam a disseminação de agentes etiológicos causadores da diarreia. A realidade cultural e ambiental é totalmente diferente de outras regiões do Brasil, as moradias, o consumo de água dos rios muitas vezes contaminada, o contato com fossas sépticas abertas no quintal das casas, o contato direto de fezes com a água do rio, e a poluição por resíduos sólidos, atribuindo a agentes etiológicos infecciosos o protagonismo no número alarmante de surtos de diarreia (GAMA et al., 2018; IMADA et al., 2016; MACHADO et al., 2010).

Segundo Vasconcelos et al (2018), geralmente os casos de diarreia estão associados ao rotavírus, representando a causa mais comum de diarreia grave na infância, sendo que temos cerca de 125 milhões de casos, onde 500.000 a 600.000 culminam em óbitos no mundo. Partindo desta análise se observa a importância de se combater estes agentes infecciosos, e na necessidade de promover através da ciência, avanços tecnológicos viáveis para esta problemática.

Desta forma, a metagenômica permite o estudo, caracterização e classificação dos vírus emergentes e reemergentes das amostras de fezes humanas, sem o uso prévio da cultura. Os estudos metagenômicos relacionados aos vírus vem atribuindo com sucesso a

descoberta de novos vírus pela eficácia do método que abrange o isolamento do DNA ou RNA até o seu sequenciamento genômico (HANDELSMAN, 2004).

Com os avanços nos estudos da metagenôma viral é possível identificar a ocorrência de outros vírus que causam a diarreia, o que permite manter uma vigilância em relação aos vírus que circulam em uma determinada região, e que venham contribuir para a ocorrências de diarreia em um determinado ambiente. As fezes de indivíduos com diarreia podem trazer importantes informações a respeito da epidemiologia molecular e da diversidade viral do local por meio da utilização do Sequenciamento de Segunda Geração (NGS) e das análises das sequencias obtidas através das ferramentas de bioinformática, isto ajuda a reconhecer um futuro espalhamento de novos vírus que ainda estão desconhecidos e não estudados na região.

O NGS tem facilitado o entendimento da diversidade viral, devido a capacidade de analisar amostras com profundidade e cobertura, possibilitando o estudo de todos os vírus no âmbito de diversidade e variabilidade gênica em diferentes amostras biológicas. Este fato, associado com a rapidez das novas descobertas virais por meio da metagenômica viral, têm se tornado uma ferramenta metodológica importante em relação às técnicas existentes, que são limitadas, para um melhor entendimento dos vírus que infectam humanos e suas inter-relações (DELWART, 2007).

A adesão na implantação da técnica de metagenômica contribui na resolução etiológica de casos clínicos, pois se prevê a possibilidade da identificação de novos vírus ou na detecção de vírus conhecidos causando um quadro clínico ainda não associado a ele na literatura (CASTRIGNANO; NAGASSE-SUGAHARA, 2015).

Nesta conjuntura, este trabalho tem importância científica na área da saúde, e pode colaborar para o desenvolvimento de vacinas, bem como o desenvolvimento de futuras drogas antivirais, assim como estudo da diversidade viral na região, partindo da necessidade de contribuir com futuros trabalhos científicos, formando uma base literária coesa e robusta, além de atribuir valor social.

1.1 ASPECTOS CLÍNICOS DA DIARREIA

Os alarmantes casos da Doença Diarreica Aguda (DDA) é uma preocupação de saúde em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento onde o impacto da doença na população afeta no desenvolvimento infantil, no alto custo com serviços médicos e ambulatoriais. Na última década se apontou o declínio da mortalidade ocorrida por diarreia, porém permanece sendo a segunda causa de morte entre as crianças menores de 5 anos, no mundo, e se destaca pela morbidade associada à diarreia que atinge crianças

um a 10 vezes por ano (BRASIL, 2019; MENEGUESSI et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2018).

A DDA é uma doença infecciosa e transmissível, provocada por diferentes enteropatógenos, principalmente por bactérias, vírus e protozoários (BÜHLER et al., 2014). As fezes aquosas ou de pouca consistência, e as vezes com a presença de muco e sangue apresenta uma consistência aquosa caracterizada pela perda de grande quantidade de água durante a evacuação, promovendo o estabelecimento rapidamente de um quadro de desidratação. A diarreia sanguinolenta (disenteria) é caracterizada pela presença de sangue nas fezes, podendo haver presença de muco e pus, sugerindo inflamação ou infecção do intestino (MACEDO et al., 2018).

A diarreia é uma manifestação clínica comum de doenças do foro gastrointestinal sendo definida em termos de volume, frequência e características das dejeções. Em termos empíricos, a diarreia é a passagem anormal de fezes moles ou líquidas, mais de três vezes ao dia e/ou de volume de fezes maior do que 200 g / dia, sendo considerada crônica quando os sintomas persistem para além das quatro semanas. Estima-se que a prevalência da diarreia crônica seja 4 a 5% nos países ocidentais (PIRES et al., 2015; POULAIN et al., 2021).

Desta forma, a diarreia aguda é uma doença infecciosa e transmissível, provocadas por diferentes agentes enteropatógenos, principalmente de ocorrência Bacteriana, Viral e Parasitaria ou de protozoários. Apresento no quadro 1, os principais agentes etiológicos atribuídos a diarreia.

Quadro 1: Agentes etiológicos causadores da diarreia.

Infecções que causam diarreia		
Bacterianas	Virais	Parasitas ou protozoários
<i>Aeromonas</i> spp.	Adenovírus	<i>Cryptosporidia</i>
<i>Campylobacter</i> spp.	Norovírus	<i>Cyclospora</i>
<i>Clostridium difficile</i>	Rotavírus	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Plesiomonas</i> spp.		<i>Giardia lamblia</i>
<i>Salmonella</i> spp.		<i>Microsporidia</i>
<i>Shigella</i> spp.		
<i>Escherichia coli</i> (êntero-hemorrágica, enterotoxigênica, êntero-invasiva)		

Fonte: adaptado Moraes e Castro (2014).

1.2 A OCORRÊNCIA DA DIARREIA AGUDA NO MUNDO E NO BRASIL

O relatório divulgado pelo Fundo da ONU para a Infância (UNICEF) em 2015, intitulado “Níveis e Tendências em Mortalidade Infantil”, aponta a diarreia como uma das principais causas de mortalidade que atinge crianças menores de cinco anos. Lamentável que o progresso mundial referido a sobrevivência infantil continua distante a muitas crianças em situações vulneráveis, representando cerca de 16.000 crianças com menos de cinco anos continuam a morrer todos os dias em 2015, e a causa são doenças que podem ser evitadas, como pneumonia, diarreia e malária. Segundo o relatório, enfatizou que o Brasil cumpriu o quarto Objetivo de Desenvolvimento do Milênio (ODM), apresentou uma queda de 73% de mortes, porém em 32 municípios o índice de mortes infantis supera 80 para cada 1.000 crianças nascidas, e enfatiza que as crianças indígenas no país têm o dobro de chances de morrer comparado com as outras crianças brasileiras. (ONU, 2015).

Vale ressaltar que a doença diarreica aguda ainda contribui diretamente nos índices de morbidade e mortalidade no Brasil, devido a relação com as precárias condições de vida, visível na ausência de saneamento básico, de desastres naturais e da desnutrição crônica (RUFINO et al, 2016). Se reforça também o conhecimento da interação da diarreia e má nutrição como causa de mortalidade havendo a necessidade de desenvolver programas de intervenção e de tratamento baseado em terapia de reidratação oral (BRASIL, 2019).

As medidas direcionadas para a redução da incidência de doenças diarreicas é um consenso entre a comunidade científica, que enfatiza a necessidade da melhoria das condições ambientais, a oferta de água potável, o tratamento adequado dos dejetos humanos, educação e segurança alimentar. Destaca - se ainda a importância do aleitamento materno por no mínimo seis meses e complementado até dois anos, impactando na redução da incidência e gravidade da doença. E pontuam sobre a importância da universalização da cobertura vacinal impactando na incidência da diarreia aguda, na redução das formas graves e no número de hospitalizações e reduzindo assim o risco de morte por essa doença (BRANDT; ANTUNES; SILVA, 2015).

As orientações indicadas por meio do Guia de Vigilância em Saúde, Brasil (2019) destacam a importância da realização da investigação em conjunto com a vigilância sanitária, vigilância ambiental, laboratório de saúde pública e outras áreas conforme necessário, e especifica sobre os surtos causados por água e alimentos. As investigações se baseiam nas especificações contidas no Manual Integrado Vigilância, Prevenção e

Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos, questionando os participantes da refeição para definir o alimento de risco e inspeção sanitária para identificar os fatores que contribuíram para a contaminação do alimento.

Bühler et al (2014) buscaram investigar os indicadores integrados de saúde e ambiente para morbimortalidade por diarreia infantil no Brasil, e concluíram que a diarreia infantil ainda permanece como o principal problema de Saúde Pública no Brasil, em relação às doenças infecciosas e parasitárias. Diante das microrregiões investigadas, as localizadas nas Regiões Norte e Nordeste do país concentraram os piores valores para os indicadores de saúde, tanto quanto para os indicadores integrados de saúde e ambiente analisados, ficando evidente a priorização do saneamento básico como medidas de prevenção e proteção à saúde infantil, na execução de políticas públicas socioambientais nas regiões com piores condições socioeconômicas do país.

As Regiões Norte e Nordeste concentram a maioria dos óbitos em menores de cinco anos, e apresentam a maior vulnerabilidade de óbito para os menores de um ano, apesar dos dados oficiais apontarem para a queda da mortalidade infantil no Brasil. A Região Norte é a segunda região mais pobre do país, depois da Nordeste, e apresenta também a maior proporção de residências sem coleta de lixo e com esgotamento sanitário a céu aberto, agravado por uma falta de tratamento correto de água, fatores sociais ambientais, econômicos e culturais, caracterizam certos grupos populacionais, de menor poder aquisitivo, levam a serem mais suscetíveis à doença, e eleva o índice de óbitos (BÜHLER et al., 2014; MACEDO et al., 2018; PEREIRA et al., 2014).

Diante da problemática dos altos índices de óbitos entre as crianças menores de um ano, é apontado o aleitamento materno como uma importante estratégia na prevenção das diarreias, conduta que deve ser estimulada pelos profissionais de saúde, como uma prática propicia para as diminuições das internações hospitalares (MENEGUESSI et al., 2015; REGO et al., 2014). E em benefício geral para toda a comunidade, a melhoria da qualidade da água diminuiu as ocorrências de doenças diarreicas de transmissão e veiculação hídrica, reduzindo os custos hospitalares em relação a doenças diarreicas, melhorando a qualidade dos rios (MENDES et al., 2015; MENEGUESSI et al., 2015).

A pesquisa de Paiva; Souza (2018) intitulada “Associação entre condições socioeconômica sanitárias e de atenção básica e a morbidade hospitalar por doenças de veiculação hídrica no Brasil” apresentou o índice de internações por contaminação hídrica, nos seguintes percentuais apresentados logo abaixo:

Tabela 1: Indicadores de saúde para doenças infectoparasitárias (DIP) e doenças relacionadas à poluição hídrica.

	DIP			Doenças relacionadas à poluição hídrica		
	Taxa de internação	Proporção de internações	Proporção de gastos	Taxa de internação	Proporção de internações	Proporção de gastos
Brasil	430,38	7,74	6,82	175,55	3,15	0,99
Norte	690,32	11,67	8,93	358,09	6,05	2,88
Nordeste	623,28	11,40	8,00	337,88	6,18	2,23
Sul	353,11	5,34	5,21	114,45	1,73	0,48
Sudeste	275,74	5,37	6,82	56,08	1,09	0,34
Centro oeste	437,72	7,43	5,82	155,12	2,63	0,88

Fonte: Paiva e Souza (2018) elaborado a partir de DATASUS.

É importante salientar a relação desta pesquisa com a doença diarreica ao analisar os dados apresentados sobre os Indicadores de saúde para doenças infecto parasitárias (DIP) e das doenças relacionadas à poluição hídrica. Desta forma é perceptível que a Região Norte se destaca com uma alta taxa de internação por doenças veiculadas pela água, sendo que no período foi de 358,09 casos por 100 mil habitantes, mais que o dobro da média nacional de 175,55. O número de internações por doenças associadas à poluição hídrica respondeu por cerca de 6% das hospitalizações totais nessas regiões. É um valor considerado elevado quando comparado à média nacional (3,2%) e ainda quando se entende que muitos desses casos poderiam ser evitados com a adoção de medidas que contribuíssem com a melhoria das condições de vida da população (PAIVA; SOUZA, 2018).

Em relação ao Estado do Amapá, o crescimento populacional urbano principalmente na Região Metropolitana de Macapá impulsionou condições insalubres para a vida humana, que reflete na porcentagem de apenas 14,8% da população com acesso a rede de esgoto ou fossa séptica, 52,8% a rede geral de água e 89,2% com coleta de lixo. Os serviços de infraestrutura, abastecimento de água, esgotamento sanitário, limpeza urbana, drenagem urbana, manejo de resíduos sólidos e de águas pluviais englobam o entendimento de Saneamento básico, e na sua ausência, a população se torna vulnerável a doenças infectocontagiosas, elevando os principalmente a incidência dos casos de diarreia (ESTADO DO AMAPÁ, 2020).

O Estado do Amapá está localizado no extremo Norte do Brasil nos limites com a Guiana Francesa ao norte, o Oceano Atlântico ao leste, o Pará ao sul e oeste e o Suriname a noroeste. A sua população é estimada de 861.773 habitantes em 2020, a capital Macapá, concentra 503.327, habitantes mais da metade da população estadual (IBGE, 2020). Suas peculiaridades se dá principalmente pela natureza exuberante e preservada, e por suas populações tradicionais. Comumente, o crescimento econômico depende de estratégias

que visem a manutenção do meio ambiente, que representa 70% do território protegido por reservas biológicas e extrativistas, parques nacionais e terras indígenas que impedem o avanço do desmatamento e outras formas de degradação (TOSTES; SOUZA; FERREIRA, 2016)

Segundo dados do SINAN - Sistema de Informação e Agravos de Notificação, no ano de 2018 foram notificados 185.066 casos de Doença Diarreia Aguda no Estado e a incidência na população variou de 39,4 a 52,6/1.000 habitantes. Observa-se que os maiores números de casos de diarreia se concentra nas cidades de Macapá e Santana, onde habita a maior parte da população amapaense (ESTADO DO AMAPÁ, 2020). Nestas cidades o aglomerado urbano se desenvolveu rápido e sem um planejamento urbano, implicando em invasões em áreas de ressacas, nas margens dos rios e nos arredores de rodovias, sem nenhum tipo de acesso a serviços essenciais (TOSTES; FEIJÃO; MOURA, 2017).

A realidade do estado do Amapá não é diferente da realidade de outros estados da Região Amazônica, onde a ocorrência de diarreia nas comunidades ribeirinhas é sempre associada a incidência de enteroparasitas, isto devido as condições que implicam no baixo nível socioeconômico, a precariedade das habitações, escassez de água tratada e, de diferentes fatores que contribuem para disseminação de agentes infecciosos, como hábitos de higiene pessoal, os cuidados no preparo e a forma de consumo de alimentos, e com o uso e manipulação da água nos domicílios. Desse modo, o acesso aos serviços básicos de saneamento e atendimento de saúde com qualidade continua sendo um desafio constante da população ribeirinha (SILVA et al., 2014).

Há uma escassez de estudos que tenha como objetivo analisar a ocorrência da diarreia no Amapá, principalmente na investigação de vírus entéricos. A ausência de políticas públicas voltadas para o saneamento básico e de uma gestão hídrica de qualidade. Em muitos casos a diarreia aguda permanece com etiologia desconhecida, podendo ter influência direta com vírus ainda desconhecidos. Desta forma, as comunidades ribeirinhas localizadas no Município de Santana são propícias para uma investigação de agentes infecciosos que podem ocasionar surtos de diarreia aguda.

1.3 ETIOLOGIA VIRAL

Van Regenmortel (2007) conceitua os vírus como um arranjo molecular, formado por proteínas e ácidos nucleicos, eventualmente com um envelope lipídico, cuja a função desta estrutura é levar a informação genética a salvo para dentro da próxima célula a ser infectada. Os vírus são pequenos, menores que bactérias, eles não podem ser cultivados em meio artificial, pois são estruturas dependentes de metabolismo celular ativo para a amplificação de seu material genético e progênie, por este motivo fora da célula animal ou vegetal o vírus é incapaz de realizar replicação. Contém somente um tipo de ácido nucleico, DNA ou RNA como código genético. Os vírus são mantidos na natureza somente se puderem serem transmitidos de um hospedeiro para o outro, da mesma espécie ou não, esta transmissão pode ocorrer de forma horizontal ou vertical. Segue abaixo as formas de transmissão dos vírus.

Quadro 2: Formas de transmissão dos vírus.

TRANSMISSÃO HORIZONTAL (Indivíduo da mesma espécie ou não).	
Contato	Pode ocorrer diretamente de um indivíduo infectado para um hospedeiro suscetível.
	Contato sexual.
	Saliva.
	Diretamente com a pele infectada.
	Indiretamente por meio de objetos ou perdigotos (aerossóis de secreções respiratórias ou saliva).
Veículo	Água ou alimentos contaminados.
Vetores	Animais vertebrados.
	Animais invertebrados, classificados como vetores biológicos (o vírus é replicado no vetor) ou vetores mecânicos (o vetor apenas carrega o vírus)
TRANSMISSÃO VERTICAL	
Transmissão do vírus da mãe para o embrião/ feto. Pode ocorrer durante a gestação ou durante o nascimento.	

Fonte: adaptado de Santos (2013).

Neste âmbito, destacam-se as patogêneses das infecções virais, especificamente aquelas de ocorrência diarreica. Estudos anteriores defendem que a maioria dos casos de gastroenterite são causados por vírus, especificamente a quatro agentes virais causadores de gastroenterite aguda: norovírus, rotavírus, adenovírus entérico e astrovírus (MARTÍNEZ AZCONA et al., 2017).

Conforme o Guia de Vigilância em Saúde, Brasil (2019) apresenta-se os principais vírus envolvidos nas doenças diarreicas agudas:

Quadro 3: Principais vírus envolvidos nas doenças diarreicas agudas.

Agente etiológico	Grupo etário dos casos	Modo de transmissão e principais fontes	Reservatório
Astrovírus	Crianças e idosos	Fecal oral, alimento, água	Provavelmente humanos
Calicivírus	Todos	Fecal oral, alimento, nosocomial	Provavelmente humanos
Adenovírus entérico	Crianças	Fecal oral, nosocomial	Provavelmente humanos
Norwalk	Todos	Fecal oral, alimento, água, pessoa a pessoa	Provavelmente humanos
Rotavírus grupo A	Crianças	Fecal oral, nosocomial, alimento, água, pessoa a pessoa	Humanos
Rotavírus grupo B	Todos	Fecal oral, água, pessoa a pessoa	Humanos
Rotavírus grupo C	Todos	Fecal oral,	Humanos

Fonte: Guia de Vigilância em Saúde, Brasil (2019).

As manifestações clínicas dos principais vírus envolvidos nas doenças diarreicas agudas tendem a discernir a compreensão da doença diante de um quadro inflamatório de mínima intensidade, mas suficiente para o aparecimento de diarreia. Com o mesmo intuito, o Guia de Vigilância em Saúde, Brasil (2019) apresenta mais um quadro elencando as principais manifestações clínicas, período de incubação e duração da doença:

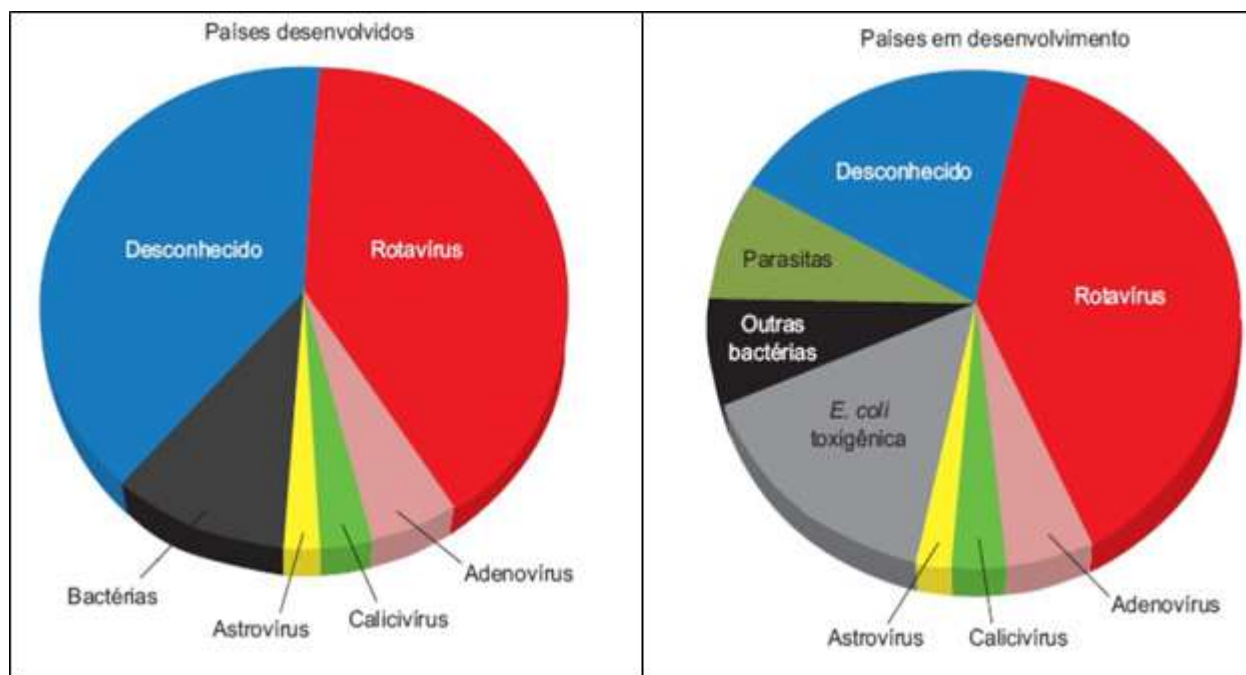
Quadro 4: As manifestações clínicas dos principais vírus envolvidos nas doenças diarreicas agudas.

Agente etiológico	Manifestações clínicas			Período de incubação	Duração de doença
	DIARREIA	FEBRE	VÔMITO		
Astrovírus	Aquosa	Eventual	Eventual	1 a 14 dias	1 a 14 dias
Calicivírus	Aquosa	Eventual	Comum em crianças	1 a 3 dias	1 a 3 dias
Adenovírus entérico	Aquosa	Comum	Comum	7 a 8 dias	8 a 12 dias
Norwalk	Aquosa	Rara	Comum	18h a 2 dias	12h a 2 dias
Rotavírus grupo A	Aquosa	Comum	Comum	1 a 3 dias	5 a 7 dias
Rotavírus grupo B	Aquosa	Rara	Variável	2 a 3 dias	3 a 7 dias
Rotavírus grupo C	Aquosa	Ignorado	Ignorado	1 a 2 dias	3 a 7 dias

Fonte: Guia de Vigilância em Saúde, Brasil (2017).

Estima-se que na ocorrência de diarreia aguda no mundo, cerca de 30 a 40% são causados por vírus, predominantemente por rotavírus, norovírus, adenovírus e astrovírus. A seguir na figura 1, temos a representação gráfica dos diferentes agentes que causam a diarreia.

Figura 1: Agentes etiológicos da diarreia em países desenvolvidos e em desenvolvimento.



Fonte: Santos (2015)

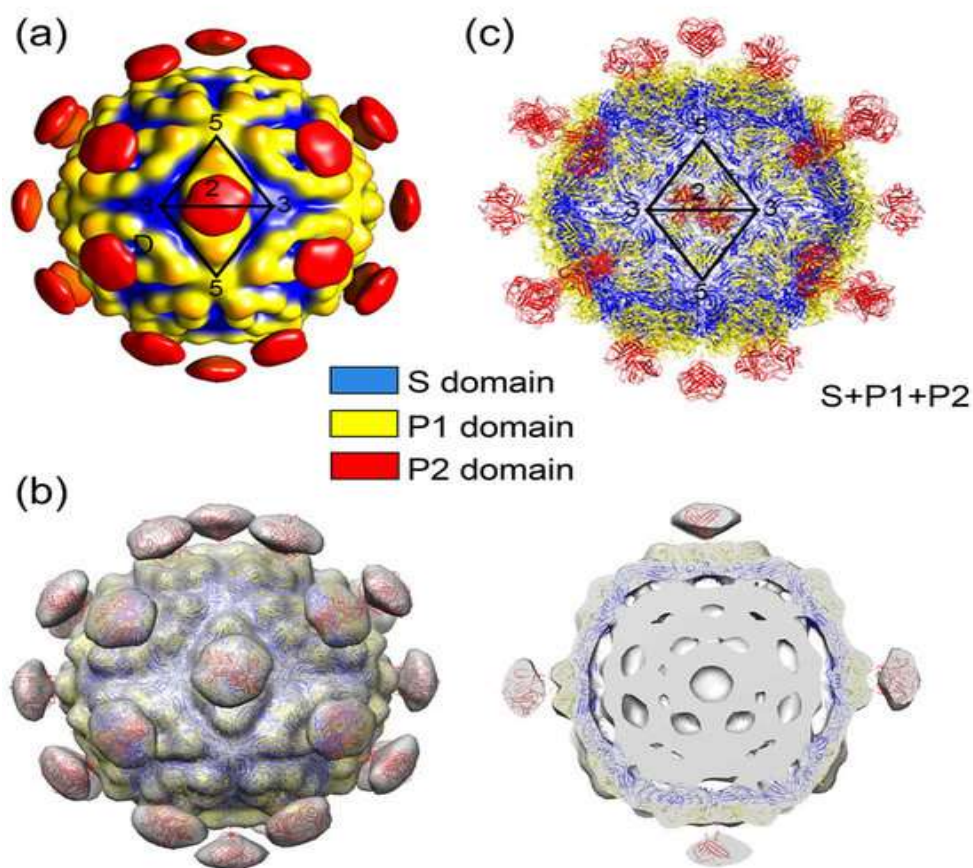
Na figura 1, o rotavírus é o principal agente etiológico de diarreia grave levando à hospitalização, em comparação com outros patógenos, tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento. A incidência de vírus desconhecidos também chama a atenção, e alerta para a importância de estudos que busquem identificar e conhecer, para a vigilância destes vírus.

1.3.1 Astrovírus

É um vírus RNA de fita simples, sem envelope, de 28–41 nm de diâmetro. O genoma RNA tem tamanho entre 6,4 e 7,7 kb, dependendo do subtipo e espécie, e contém uma proteína VPg ligada covalentemente no final de 5' o que provavelmente contribui para a infectividade do vírus. Pertencentes à família *Astroviridae* dividida em dois gêneros: *Mamastrovirus* e *Avastrovirus* (FINKBEINER et al., 2009b; OLOTEGUI et al., 2018; VU et al., 2016).

Os astrovírus são classificados em oito tipos de antígenos com base em técnicas de imunofluorescência com anticorpos policlonais e monoclonais contra vírus isolados em cultura. Estima-se que sejam responsáveis por 2% a 9% da diarreia infantil não bacteriana aguda, com novas cepas ligadas às consequências do sistema nervoso central (incluindo meningite e encefalite) em crianças. A doença ocorre principalmente em crianças pequenas e adultos imunocomprometidos, e embora os sintomas em adultos sejam raros, a soroprevalência para cepas comuns é alta (FINKBEINER et al., 2009a; OLOTEGUI et al., 2018).

Figura 2: Representação esquemática do astrovírus humano.



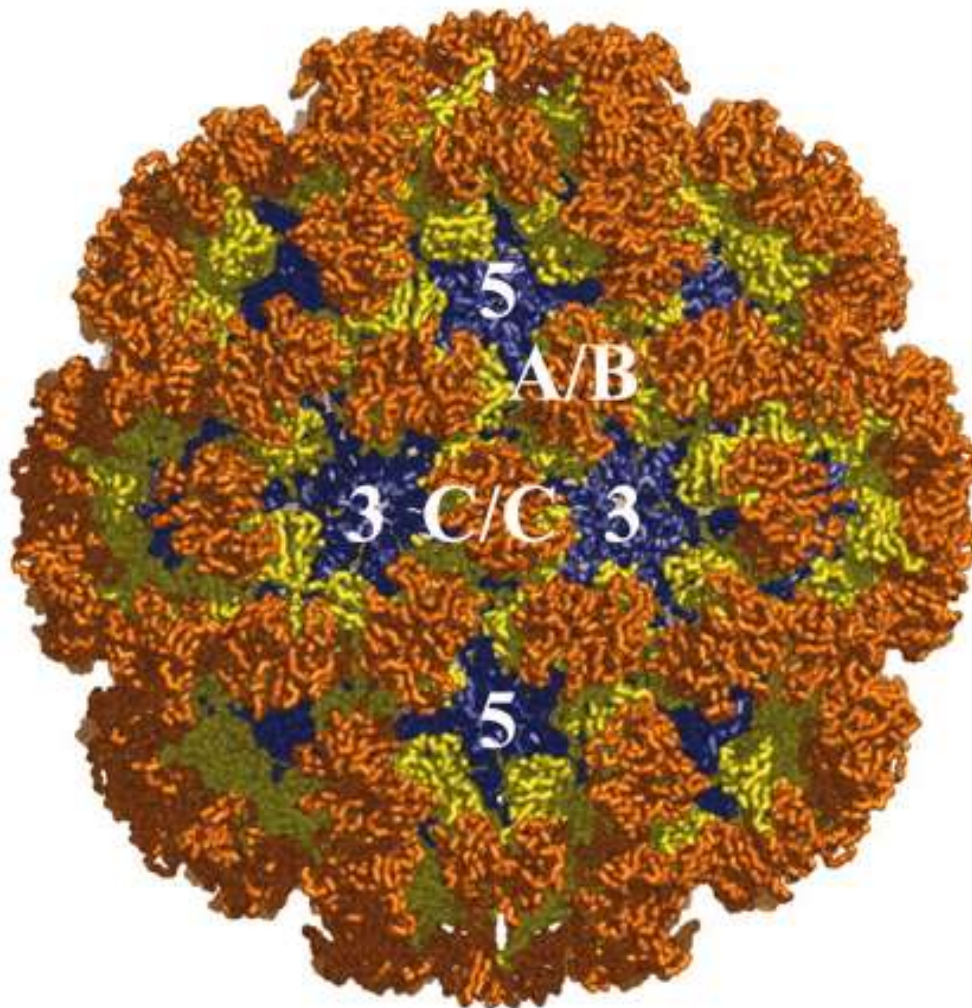
Fonte: Toh et al (2016)

1.3.2 Calicivírus

Estes vírus são membros da família *Caliciviridae* e possuem dois gêneros descritos. Os norovírus (anteriormente denominados "vírus parecidos com Norwalk") e os sapovírus (anteriormente denominados "vírus semelhantes a Sapporo"). Os noro- e sapovírus humanos são classificados em 5-6 genogrupos (I-VI), cada grupo contendo 1-19 genótipos diferentes. Norovírus de diferentes genótipos co-circulam, mas os norovírus genótipo II-4 predominam em todo o mundo. A recombinação genética entre as cepas de norovírus e sapovírus não é infrequente (DESSELBERGER, 2017).

São compostos de uma única proteína estrutural do capsídeo com simetria icosaédrica. Esta proteína, composta por 180 moléculas, dobra-se em 90 dímeros, que formam uma concha contínua com protuberâncias em forma de arco. Uma característica fundamental é a existência de 32 depressões em forma de taça, situadas nos eixos do icosaedro, cuja designação latina, cálice, o nome do vírus (VINJÉ et al., 2019).

Figura 3: Estrutura dos Calicivirus.

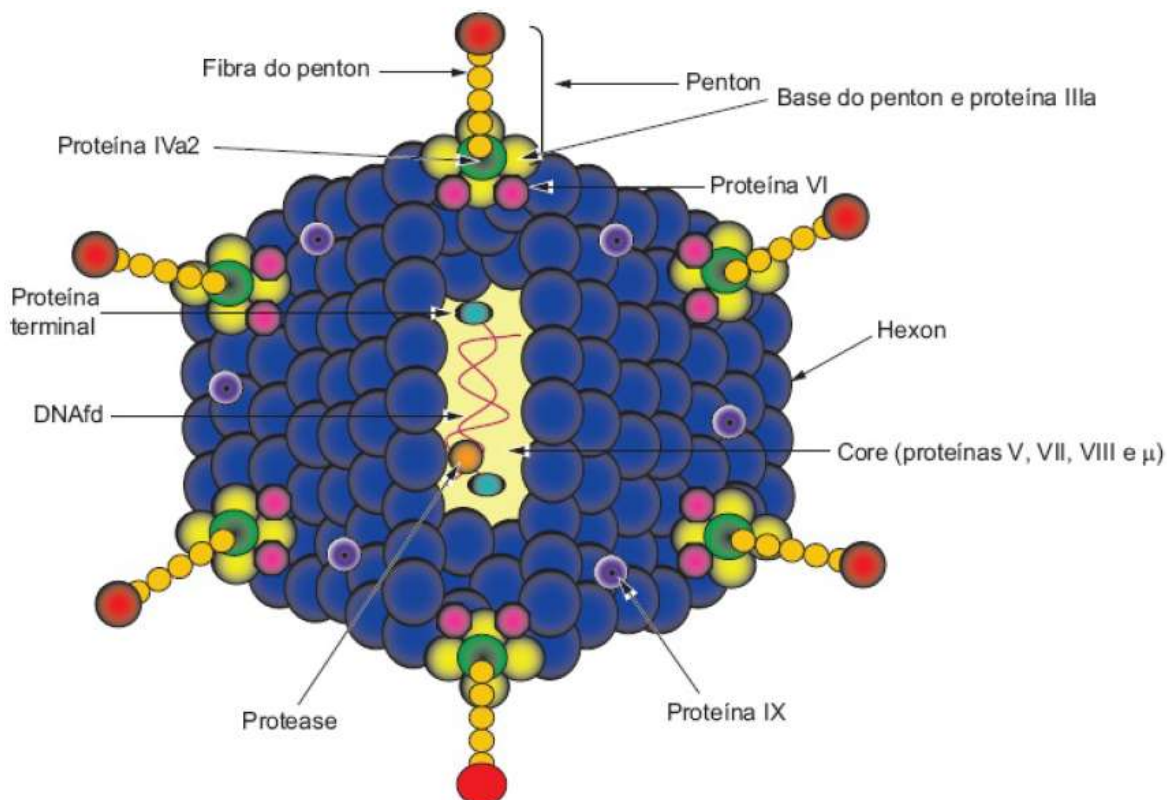


Fonte: Chen et al (2006)

1.3.3 Adenovírus entérico

Pertencem à família *Adenoviridae* e, dentro do gênero, a maioria dos adenovírus entéricos pertencente ao subgênero F. Eles são vírus DNA sem envelope, diâmetro de 70 nm e simetria icosaédrica. O capsídeo proteico é composto de 252 capsômeros - 240 *hexones* e 12 *pentones* - e estruturas chamadas fibras que se projetam para o exterior. Os *hexones* contêm as proteínas II, VI, VIII e IX, que participam da estabilidade e montagem da partícula viral. As proteínas *pentones* (III e IIIa) têm a função de penetração celular, e as fibras são hemaglutininas e são responsáveis por ligar o vírus aos receptores. Existem pelo menos oito proteínas que compõem o núcleo; estas mantêm a integridade do genoma e participam da atividade enzimática. O genoma consiste em uma molécula linear de DNA de fita dupla que representa 15% da massa viral (DESSELBERGER, 2017; FERREIRA et al., 2014; QIU et al., 2018).

Figura 4: Estrutura esquemática de uma partícula de adenovírus entérico.



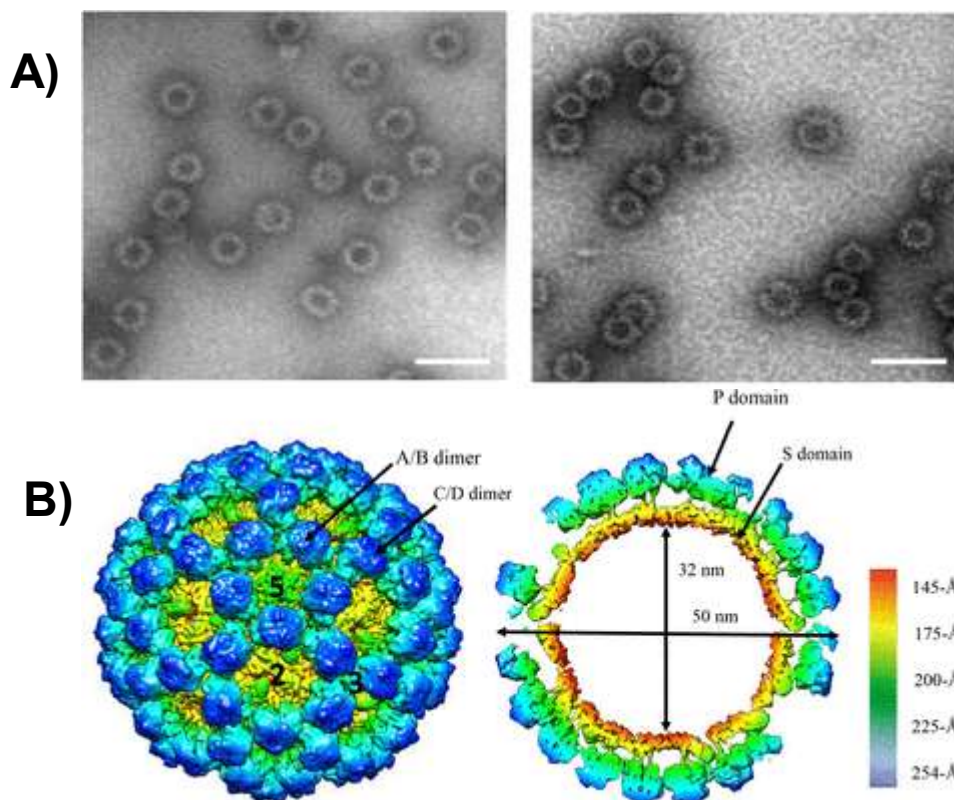
Fonte: Santos (2019)

1.3.4 Norwalk

Os vírus pertencentes ao gênero *Norovirus* são responsáveis pela maioria de todas as epidemias de gastroenterites não bacterianas e uma das principais causas de diarreia global. A infecção pelo vírus Norwalk induz uma resposta específica de anticorpos IgG, IgA e IgM, mesmo que tenha ocorrido exposição prévia (MANUEL; MOORE; JAYKUS, 2018).

As partículas virais do vírus Norwalk (VLPs) se ligam menos aos antígenos do grupo histoquímico B do que aos antígenos do grupo histoquímico A ou H, e as pessoas em quem os antígenos do grupo B são expressos têm menor probabilidade de ficar doentes se infectado com o vírus Norwalk. Da mesma forma, pessoas com anticorpos séricos que bloqueiam a ligação do vírus Norwalk ao antígeno do grupo histoquímico H tipo 1 são menos propensas a ficar doentes se infectadas com o vírus Norwalk (LAMOUNIER et al., 2015; RAMANI et al., 2015).

Figura 5: morfologia de norovírus. A) visualização em microscópio eletrônico. B) estrutura morfológica desenvolvida em programas computacionais.



Fonte: adaptado de Devant; Hofhaus e Hansman (2019)

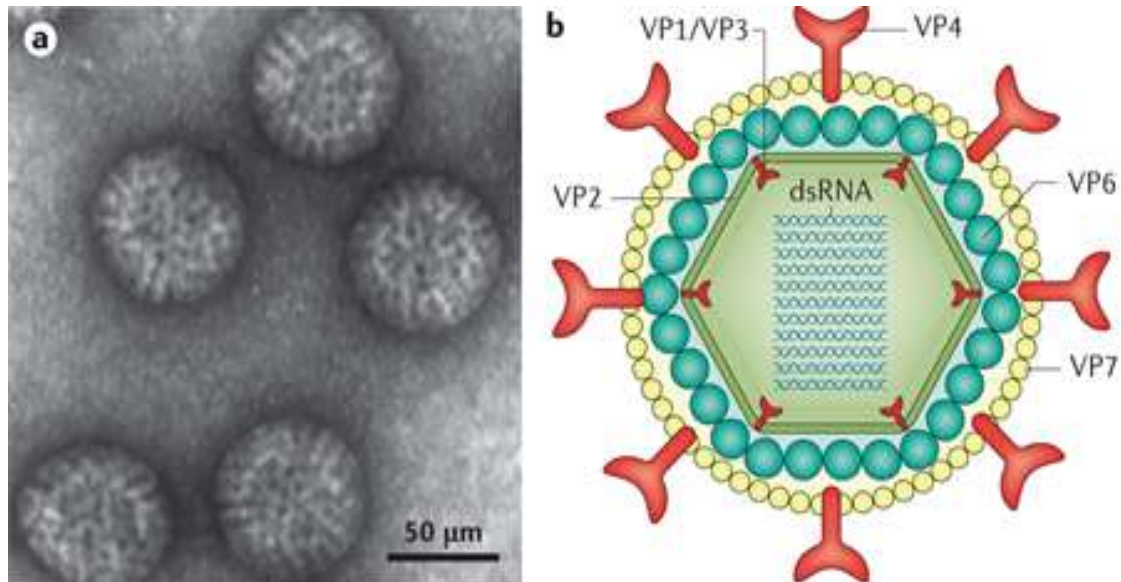
1.3.5 Rotavírus

Os rotavírus são membros da família Reoviridae, e são caracterizados por sua estrutura icosaédrica não envelopada e diâmetro de 70 nm. Quando observados sob um microscópio eletrônico, eles têm uma forma de 'roda'. O capsídeo consiste em uma camada dupla de proteína; o capsídeo externo é composto pelas proteínas estruturais VP7 e VP4 e o capsídeo interno, principalmente de VP6. O material genético envolto pelo capsídeo é encontrado dentro do capsídeo interno e envolve o genoma do rotavírus, composto de 11 segmentos de RNA de fita dupla. Dada a natureza segmentada do genoma do RNA, co-infecção de células com duas cepas diferentes de rotavírus pode resultar em vírus recombinante, com segmentos de RNA de cada um dos progenitores (DESSELBERGER, 2017; GONZALEZ-OCHOA et al., 2017; KANAI et al., 2019; LESTARI et al., 2020).

Os rotavírus são classificados em grupos, subgrupos e sorotipos de acordo com as propriedades antigênicas das proteínas do capsídeo. A proteína VP6 é o determinante da reatividade do grupo, com sete grupos atualmente existentes, rotulados AG, e dois subgrupos, I e II. Grupos A, B e C são aqueles que produzem infecção em humanos. A classificação em sorotipos é baseada nas diferenças antigênicas nas proteínas do capsídeo externo, VP7 e VP4. A primeira, uma glicoproteína, determina a especificidade do tipo G e

a segunda, a especificidade do tipo P, devido à sua sensibilidade à protease. Atualmente, existem 15 tipos de G, sendo os G1, G2, G3 e G4 os predominantes em todo o mundo (ARNOLD, 2016; JUSTINO et al., 2019; LUCHS; TIMENETSKY, 2016).

Figura 6: A partícula do rotavírus. A) Micrografia eletrônica de partículas de rotavírus. B) Esquema em corte transversal da partícula de rotavírus.



Fonte: Crawford (2017)

É bastante comum associar os casos de diarreia ao rotavírus, no entanto as rotaviroses passaram a ser prevenidas por meio da vacinação, e é possível que outros agentes virais possam estar causando diarreias, partindo do pressuposto que a etiologia de muitas doenças humanas é desconhecida, destas em mais de 50% dos casos a etiologia é ignorada. Os avanços na identificação e caracterização dos vírus chegaram com os sequenciadores de nova geração, facilitando as pesquisas e promovendo descobertas significativas através da metagenômica viral (LUCHS; TIMENETSKY, 2016).

A metagenômica é uma realidade na detecção de vírus relacionados a ocorrência da diarreia, principalmente na detecção de vírus emergentes, o que possibilita a caracterização desses novos agentes, e a investigação da sua participação nos casos de diarreia em seres humanos, entre eles, destaque para os seguintes vírus: Bocavírus humano (WATANABE et al., 2018), Picornavírus associados a infecções entéricas (DAI et al., 2010), Vírus Aichi (SDIRI-LOULIZI et al., 2009), salivírus (SHAN et al., 2010), e cosavírus humano (HOLTZ et al., 2008).

1.4 ESTUDOS EM METAGENÔMICA VIRAL

A Metagenômica está revolucionando o campo da descoberta de vírus, destacando - se a abordagem do transcrito completo que fornece uma rica fonte de dados que pode ser usada para caracterizar a estrutura viral, proporcionando novas perspectivas sobre a diversidade viral e evolução (LUCHS et al., 2018). A Metagenômica pode detectar todos os patógenos conhecidos, especialmente vírus RNA conhecidos em tipos inesperados de amostras, fornecendo a resolução de um único nucleotídeo para definir estirpe parentesco por surto epidemiológico e, quando disponíveis, a resistência antiviral (GRENINGER, 2018).

Metagenômica viral é um termo utilizado para a avaliação genômica de todos os vírus existentes em amostras ambientais ou biológicas, onde se pontualiza a presença de diversidade viral, e na identificação do genoma de prováveis vírus patológicos, onde várias vezes técnicas usuais não conseguem detectá-los, ou seja, o termo “metagenômica” se refere a análise do conjunto dos genomas microbiano de uma amostra ambiental, na sua estrutura sequencial e de suas funções (CASTRIGNANO; NAGASSE-SUGAHARA, 2015; HANDELSMAN, 2004).

A abordagem da metagenômica viral contribui ativamente na descoberta de novos vírus, através de inúmeras sequencias genômicas, que rigorosamente catalogadas nas bases públicas de dados fomentam os resultados de outras pesquisas, e devido as características possibilitam a detecção de todos os genomas virais independente de antissoros, e de conhecimento prévio do genoma viral (CASTRIGNANO; NAGASSE-SUGAHARA, 2015; DÁVILA-RAMOS et al., 2019; DELWART, 2013).

Diversos estudos que utilizaram a metagenômica, obtiveram sucesso na detecção de vírus entéricos e novos vírus. Entre estes, estudos realizados na China (DAI et al., 2010; SHAN et al., 2010), na Venezuela (GONZÁLEZ; LIPRANDI; LUDERT, 2011), no Chile (PHAN et al., 2012), e no Brasil (CILLI et al., 2019; LUCHS et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018; WATANABE et al., 2018) propuseram discernir os surtos de diarreia, partindo das diversas análises convencionais que não detectaram agentes virais, o que possibilitou a aplicação do sequenciamento a partir das tecnologias de Nova Geração, primordial para a detecção de vírus conhecidos e novos vírus, resultando em uma investigação minuciosa a partir dos dados demográficos, para entender a epidemiologia destes agentes infecciosos.

O método metagenômico exige um rígido protocolo que inicia na coleta do material do meio ambiente, seguido do processamento da amostra, isolamento do DNA ou RNA por técnica de lise, a amplificação de DNA ou RNA, a construção da biblioteca, o sequenciamento e as análises realizadas por bioinformática (BIBBY, 2013). Este se inicia com a obtenção e o processamento de amostras ambientais, realizado por filtrações,

seguidos por centrifugações (WOOLEY; GODZIK; FRIEDBERG, 2010). Os filtros de 0,45 e/ou 0,22 μm são utilizados com a finalidade de eliminar a contaminação por células hospedeiras e por outros microrganismos. As partículas virais são menores que os organismos eucarióticos (FANCELLO; RAOULT; DESNUES, 2012).

O DNA é fragmentado em pedaços menores, as sequências geradas se sobrepõem em muitas regiões, sendo possível montar esses fragmentos e obter-se a sequência original ao final do processo. Outros métodos de sequenciamento são utilizados, sendo o mais popular e eficiente, sujeito a automatização é o da terminação de cadeia (Sequenciamento de *Sanger*), capaz de gerar sequências, de tamanhos entre 800 e 1000 pares de bases. Devido ao alto custo financeiro, se desenvolveram tecnologias de baixo valor aquisitivo, porém, de alto rendimento, que paralelizam o processo de sequenciamento e geram milhões de sequências de uma vez (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

O sequenciador MiSeq da empresa Illumina é uma das principais escolhas dos centros de sequenciamento, possui a capacidade de gerar até 15 Gb de informação ou 25 milhões de leituras de até 600 pb por corrida (ILLUMINA, 2021). A plataforma Illumina é baseada na montagem de uma biblioteca de DNA, por fragmentação aleatória de amostras de DNA. Posteriormente a adição de adaptadores universais nos fragmentos, estes, são espalhados em uma lamina (conhecida como “*flow cell*”) com 8 linhas/ pistas (conhecida como “*lane*”) imobilizadas em vidro. Após a amplificação por ponte é gerado um grande número de moldes idênticos sobre a superfície de vidro (conhecido como formação de “clusters”). Em cada ciclo, um único nucleotídeo marcado por fluorescência é incorporado a cada cadeia complementar. Após a incorporação, o marcador fluorescente é detectado e é gerada uma imagem, e os ciclos seguintes ocorrem da mesma forma (LEDERGERBER; DESSIMOZ, 2011).

Os milhões de *reads* gerados pelo Sequenciamento de Alto Desempenho devem ser processadas em *softwares* adequados. Os *pipelines* computacionais utilizados para análise de metagenomas normalmente começam com a remoção dos adaptadores e filtragem de sequências de baixa qualidade. Geralmente, as bases com qualidade ≥ 20 são consideradas de alta qualidade, desta forma, as bases com qualidade menor devem ser removidas ou processadas de modo a eliminar a região com baixa qualidade, pois as mesmas podem levar a resultados enviesados (CHEN et al., 2014; PENG et al., 2015; SANGWAN et al., 2012).

1. 5 BIOINFORMÁTICA

A bioinformática é uma ciência multidisciplinar embasada por técnicas computacionais e matemáticas relacionadas ao conhecimento químico, físico e biológico, em constante movimento que consiste em uma dinâmica na criação de novos programas afim de gerir dados de NGS. Sendo assim, a bioinformática incube na análise dos dados gerados a partir da liberação dos resultados pelo sequenciamento, e fornece informações para uma compreensão conclusiva sobre a população viral (AYYILDIZ; PIAZZA, 2019; FANCELLO; RAOULT; DESNUES, 2012; STRASSER, 2010).

O sequenciamento processa sequências curtas, denominadas “*reads*”, e a montagem previa de sequências mais longas, são formadas a partir da sobreposição do *reads*, denominadas “*contigs*”, desta forma são alinhadas com genomas ou genes de referência, depositados nos bancos de dados como, o GenBank do site NCBI (National Center for Biotechnology Information) (BIBBY, 2013).

Com o método de metagenômica aplicada nas análises de amostras de fezes humana é possível a detecção e classificação de vírus entéricos conhecidos, co-infecções virais e novos vírus presentes nas fezes durante episódios de diarreia aguda. Neste sentido, este trabalho buscou através da abordagem metagenômica investigar a seguinte problemática: “Existe a relação de outros vírus ainda não identificados ou reemergentes, serem os agentes causadores da ocorrência de diarreia em comunidades ribeirinhas do município de Santana - AP?”.

Com este intuito, o objetivo deste estudo foi detectar sequências de vírus emergentes e reemergente em amostras de fezes de indivíduos com morbidade em diarreia nas comunidades de ribeirinhas do município de Santana – AP, por meio da técnica de metagenômica, visando contribuir diretamente com os estudos de investigação dos agentes etiológicos que protagonizam surtos de diarreia.

2.1 OBJETIVO GERAL

- Detectar sequências de vírus entéricos em amostras fecais de pacientes residentes de comunidades ribeirinhas do município de Santana, Amapá, Amazônia Oriental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil socioeconômico, demográfico, cultural e ambiental das áreas onde residem os pacientes em estudo;
- Detectar sequências de vírus presente nas amostras fecais dos pacientes, através do sequenciamento genômico;
- Analisar no banco de dados genômicos GenBank as sequências virais obtidas no sequenciamento;

3.1 PACIENTES E ASPECTOS ÉTICOS

Foram estudadas 53 amostras de fezes de pacientes, entre crianças, adolescentes, adultos e idosos que buscavam atendimento nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) do Distrito de Anauerapucu e do Bairro Elesbão, e de pacientes residentes na região do Rio Matapí. O presente estudo teve caráter transversal e prospectivo.

A coleta foi realizada entre os meses de julho e setembro de 2019, no município de Santana que está situado ao sul do estado do Amapá, há 17 km da capital Macapá, é o segundo município mais populoso do estado, com uma população estimada de 123.096 habitantes (IBGE, 2020). Segundo a classificação de Köppen e Geiger na região é predominante o clima Tropical chuvoso com a temperatura média de 27.1 °C (VILHENA, 2017).

O estudo foi iniciado somente após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Amapá parecer nº: 3.442.352 no dia 10 de julho de 2019 e aprovado também no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo, Nº Parecer: 3.689.032 no dia 06 de novembro de 2019 (ANEXO 1). As amostras foram coletadas após o aceite do participante do estudo e posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 2). Todas as amostras e dados obtidos foram identificados por iniciais dos nomes ou números, garantindo assim a confidencialidade dos participantes.

3.2 COLETA DO MATERIAL FECAL E DADOS DEMOGRÁFICOS

A coleta do material fecal foi realizada em um recipiente coletor universal para fezes sem conservante doado pela Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), sendo que a coleta de material fecal das crianças foi feita pelo cuidador ou responsável. Foi transferido com auxílio da pазinha as fezes com um tamanho parecido com uma azeitona pequena para o recipiente de coleta. Após isso, o material foi colocado em geladeira até o momento do transporte do recipiente coletor para o Laboratório de Artrópodes da UNIFAP. As fezes ficaram no máximo por 24 horas na geladeira até serem aliquotadas. Após isso, foram transferidas para tubos cônicos de 2 mL e armazenadas em freezer -20°C até o transporte para o Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

Juntamente com cada amostra de fezes, foi preenchido um formulário para obtenção dos dados de cada paciente com informações socioeconômica, demográfica e cultural, bem como uma análise das condições ambientais do local de moradia de cada voluntário (ANEXO 4).

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Inicialmente, 2g de fezes foram homogeneizadas com 1 mL de PBS e 50uL de *beads* de sílica e esferas de vidro, seguido de centrifugação e filtragem de 500uL do sobrenadante, o produto da filtragem passou por tratamento com nucleases. Posteriormente, ocorreu a geração do DNA complementar (cDNA) e síntese de fita complementar, possibilitando a preparação das bibliotecas.

Após homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas a $5.000 \times g$ por 5 minutos, e aproximadamente 200µL do sobrenadante foram filtrados em filtro de 0,45 µm (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) para remover partículas de tamanho de células eucarióticas, bacterianas e outros debris.

O sedimento rico em partículas virais foi tratado com uma combinação de enzimas nuclease: TURBO Dnase e Mix de Enzima para Cocktail de RNase (Thermo Fischer Scientific, CA, EUA); DNase Baseline-ZERO (Epicenter, WI, EUA); Benzonase (Darmstadt, Alemanha); e RNase RQ1 Solução livre de DNase e RNase A (Promega, WI, EUA). A fim de digerir ácidos nucleicos desprotegidos e deixar somente as partículas virais intactas. A mistura foi incubada a 37 ° C durante 1 hora e 20 minutos para digestão enzimática.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA/ RNA

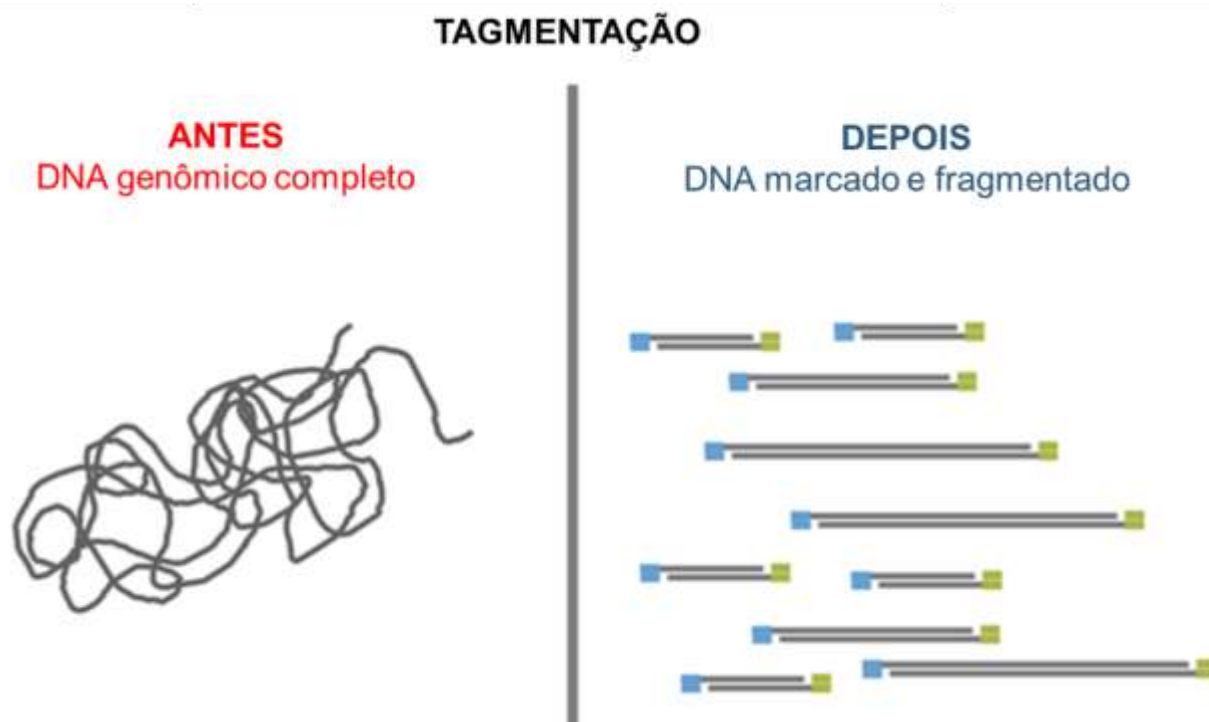
Os ácidos nucleicos virais foram purificados, da mistura digerida mencionada acima, utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valência), conforme protocolo do fabricante. A síntese da fita de DNA complementar (cDNA) foi realizada com a enzima Transcriptase Reversa AMV (Promega, WI, EUA). Foi sintetizada uma segunda fita para a cadeia de cDNA, utilizando DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragmento (Promega, WI, EUA).

3.5 PREPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS

Posteriormente, o Kit Nextera XT (Illumina, CA, USA) foi utilizado para construção das bibliotecas de DNA. Resumidamente, cada amostra foi quantificada pelo Qiubit (Thermo Fisher Scientific) e diluídas para concentração de 0,5 nM/uL. Para tagmentação (fragmentação dos ácidos nucleicos por uma enzima transposase e adição de sequências adaptadoras em uma etapa – adição de *tags*) foi preparada uma placa e adicionado 5 µL do *Buffer Tagmentation DNA* (TDB), 2,5 µL dos ácidos nucleicos extraídos, purificados e diluídos, 2,5 µL do *Amplicon Tagment Mix* (ATM). Nesta etapa ocorre a adição das

sequências adaptadoras necessárias para as etapas posteriores como o sequenciamento (Figura 7).

Figura 7: Esquema mostrando a etapa de tagmentação do kit Nextera XT.

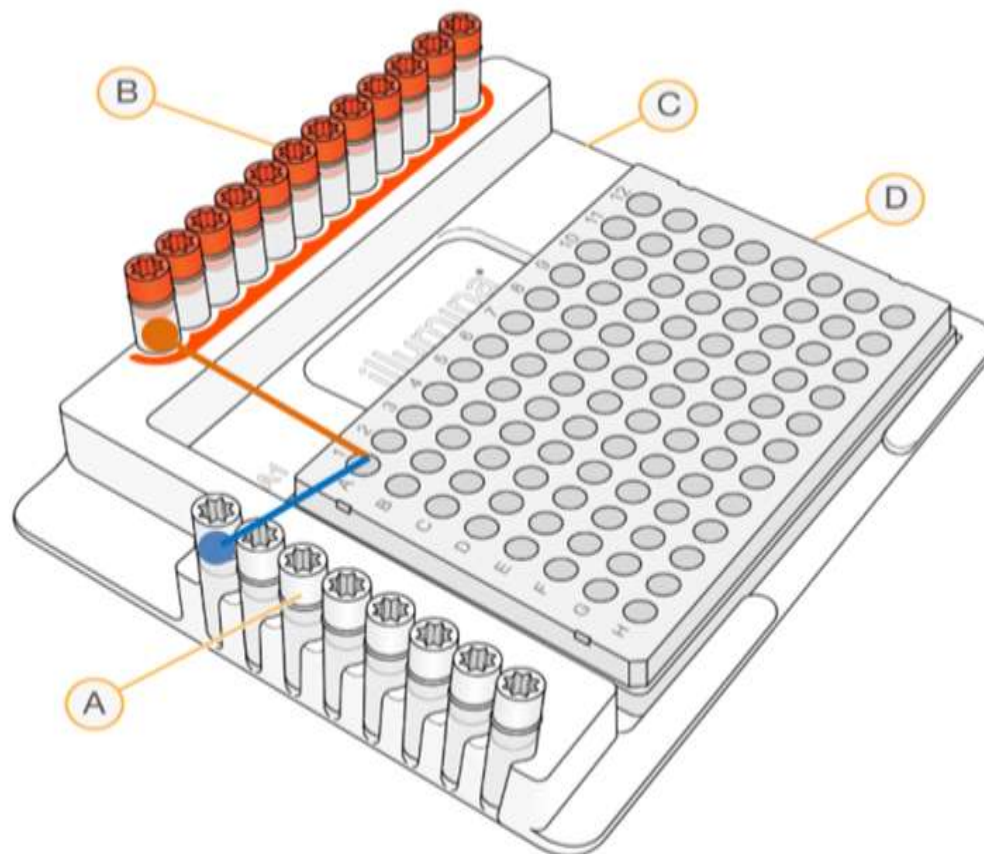


Fonte: adaptada do *Nextera XT DNA Library Prep Kit Reference Guide* (Illumina, Inc). Em azul o *primer* do sequenciamento (*read 1*) e em verde o *primer* do sequenciamento (*read 2*).

A placa foi selada, centrifugada a 280 RCF por 1 minuto e colocada em um termobloco a 55° C por 5 minutos. Para neutralizar a reação foi adicionado 2,5 µL do *Neutralize Tagment* (NT) e a placa foi selada, passou por um *spin* de 7 segundos e incubada por 5 minutos em temperatura ambiente.

Para adicionar os index foi adicionado, em uma nova placa identificada como NPM, 7,5 µL do *Nextera PCR MIX* (NPM), 2,5 µL do índice 2 (i5) que possui tampa branca, em cada linha da placa (A-H) e 2,5µL do índice 1 (i7) que possui tampa laranja, em cada coluna da placa (1-12) (Figura 8).

Figura 8: Representação da preparação da placa para distribuição dos indexes.

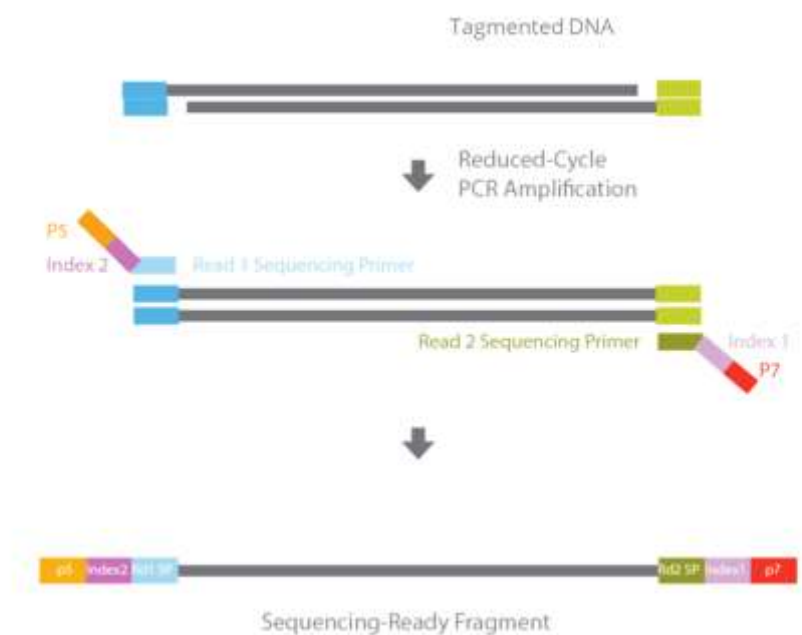


- A Rows A–H: Index 2 (i5) adapters (white caps)
- B Columns 1–12: Index 1 (i7) adapters (orange caps)
- C TruSeq Index Plate Fixture
- D Hard-Shell PCR plate

Fonte: *Nextera XT DNA Library Prep Kit Reference Guide* (Illumina, Inc).

O conteúdo dessa placa foi adicionado na placa anterior e esta foi selada, centrifugada e colocada no termociclador na seguinte ciclagem: 72° C por 3 minutos, 95° C por 30 segundos seguido por 15 ciclos de denaturação a 95° C por 10 segundos, anelamento a 55° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos, seguida por uma extensão final de 5 minutos. Nesta etapa ocorre a adição dos index e sequencias adaptadoras ao DNA que foi tagmentado e pela PCR ocorre o enriquecimento Figuras 9 e 10).

Figura 9: Adição dos index e seqüências adaptadoras ao DNA.



Fonte: *Nextera XT DNA Library Prep Kit Reference Guide* (Illumina, Inc).

Figura 10: organização dos index e seqüências adaptadoras.



Fonte: *Nextera XT DNA Library Prep Kit Reference Guide* (Illumina, Inc).

Para a purificação da PCR, 25 µL foram transferidos para uma nova placa, sendo adicionado 45 µL da *AMPure XP beads* homogeneizado; a placa foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos, seguida pela sua colocação em uma *rack* magnética por 2 minutos. O volume do Ampure XP define a concentração utilizada e se relaciona com o fragmento a ser purificado, assim ao utilizar 45 uL correspondeu a 0,9X do Ampure XP e selecionou fragmentos entre 300 e 500 bases para uma reação de sequenciamento de 2 x de 300 ciclos com o Kit V3 600 ciclos.

Para lavar as *beads* foram adicionados 200 µL de etanol 80% recém-preparado, a placa foi incubada por 30 segundos na *rack* magnética e o sobrenadante descartado, foi feita a repetição da lavagem com etanol.

Após a segunda lavagem a placa foi deixada em temperatura ambiente por 15 minutos para a total evaporação do etanol. Após a placa estar seca, ela foi retirada da *rack* magnética e foram adicionados 25 μ L do *Ressuspension Buffer*, a placa foi incubada em temperatura ambiente por 2 minutos, seguida pela sua adição na *rack* magnética por 2 minutos ou até que o sobrenadante ficasse límpido. O sobrenadante foi então transferido para uma nova placa.

Para que as quantificações das bibliotecas fiquem equivalentes foi realizada a normalização, onde foram transferidos 20 μ L do material purificado para uma nova placa, foi adicionado 22,5 μ L da solução LNA1/LNB1, a placa foi selada e colocada em um aparelho do tipo *vórtex* por 1800 RPM por 30 minutos. Após esta etapa a placa foi colocada na *rack* magnética por 2 minutos, e o sobrenadante foi desprezado.

As *beads* foram lavadas usando 22,5 μ L do LNW, após isto a placa foi selada novamente e colocada no aparelho do tipo *vórtex* por mais 5 minutos. Após isto, a placa foi colocada na *rack* magnética por 2 minutos, sendo descartado o sobrenadante. Essa etapa de lavagem foi repetida.

Após a última lavagem, a placa foi retirada da *rack* magnética e foram adicionados 30 μ L de uma solução de NaOH 0,1N. Para isso, preparamos uma solução de NaOH a 1N, no dia deste procedimento e diluímos para 0,1N. A placa foi selada e colocada no aparelho do tipo *vórtex* por mais 5 minutos. Após a eluição, a placa foi colocada novamente na *rack* magnética por 2 minutos e foi transferido o sobrenadante para uma nova placa identificada como SGP.

Cada biblioteca foi quantificada (normalizada) utilizando o kit *KAPA Library quantification*. Para as reações dos padrões foram pipetados 6 μ L do *master mix* do kit e 4 μ L do padrão do kit *KAPA* diluído (1:1000, 1:2000 e 1:8000). Para as reações das amostras foi adicionado 6 μ L do máster mix e 4 μ L das respectivas amostras. A placa foi selada e centrifugada antes de ser colocada no 7500 Real Time PCR (Thermo Fisher).

Para a preparação do *Pooled Amplicon Library* (PAL) foi feito um *pool* das bibliotecas normalizadas (com as concentrações equimolares com volume de 5 μ L cada), que foram quantificadas utilizando o kit *KAPA Library quantification*.

A concentração do PAL para as bibliotecas ficou em 660 pM. A partir daí realizamos diluições para ajustar para uma concentração 12 pM (definição da concentração de forma arbitrária para o sequenciamento).

A concentração do PAL para as bibliotecas ficou em 809,08 pM. A partir daí realizamos diluições para ajustar para uma concentração 8pM (concentração de forma arbitrária para o sequenciamento).

Após a diluição do PAL retiramos 6µL e adicionamos o PhiX numa concentração final de 1%. Após isso, desnaturar o PAL com NaOH a 0,2 N a 96°C por 5 minutos e choque com gelo por 2 minutos e sequenciar no MiSeq Sequencer (Illumina, CA, EUA).

3.6 ANÁLISES DOS DADOS

Os *reads*/fragmentos sequenciados de 300 pares de bases (pb) em *pair-end* (sequencia senso a antisenso, com total de 600pb na plataforma *Miseq* foram trimados (retiradas as sequencias dos adaptadores, *barcoding*se as de baixa qualidade). O sequenciamento apresentou um *Phred quality score* >30 (Q30), ou seja, uma base incorreta em 1000 vezes que ela é lida e virtualmente o erro tendeu a zero. O *Phred quality score* é a medida de qualidade das bases sequenciadas em tempo real durante a corrida.

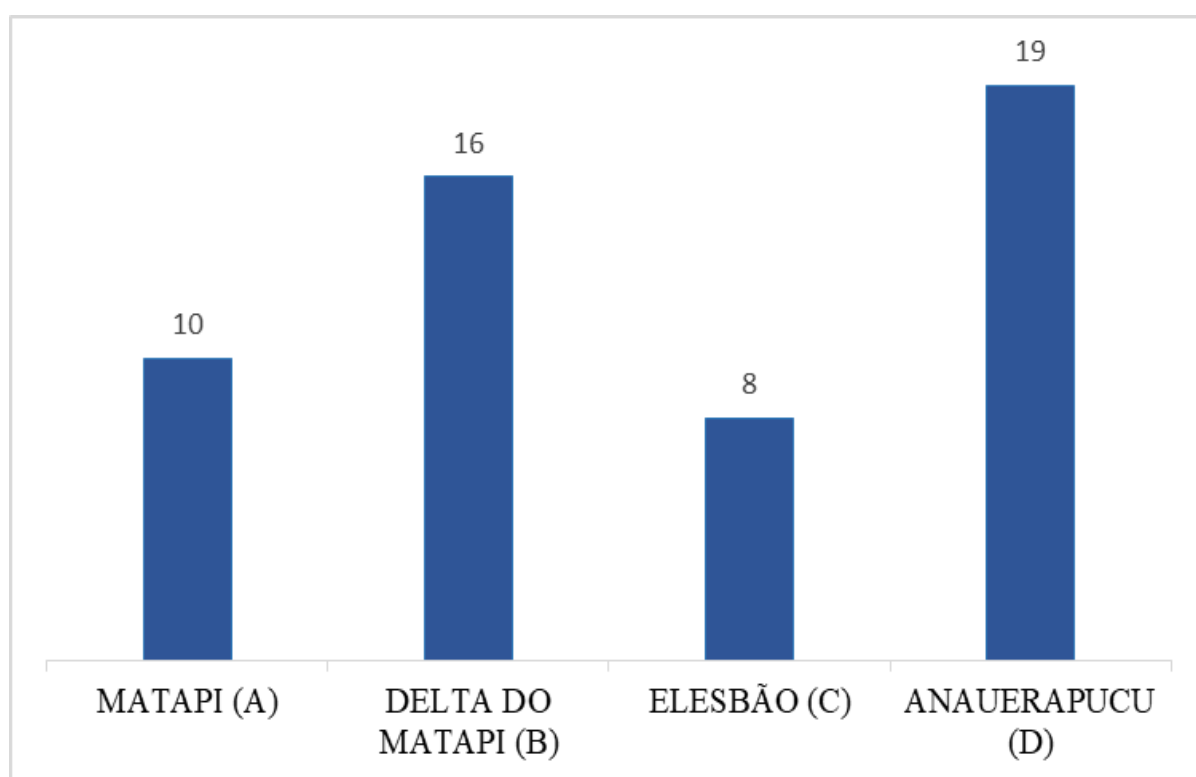
Os arquivos *FastQ* gerados foram enviados para o Laboratório do Dr. Eric Delwart da Universidade da Califórnia (UCSF/Instituto Vitalant) para serem analisadas por meio de um *pipeline* publicado por Deng Xutao et al, 2014. Neste *pipeline* os milhares a bilhares de sequências curtas geradas (*short reads*) foram montadas por meio do *de novo assembly*, sendo os reads mapeados contra o genoma humano (Hg39) e posteriormente excluídos; sequências de baixa qualidade (*Phred*<10) foram excluídas; foram utilizados alguns *assemblers* (*softwares* que fazem montagens *de novo*) usando o algoritmo do Gráfico de *Bruijn* e o *assemblers* tradicionais *olconsensus* (*OLC*) *algorithms* descritos no trabalho de Xutao e cols referido acima.

Após dois meses, recebemos as análises contendo todas as sequencias virais identificadas nas amostras com alta qualidade de alinhamento às sequências no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Os singlets e contigs foram enviados para o *BLASTx* para estudo de similaridade de proteínas de todas as sequencias virais no *RefSeq vírus* do *Genbank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/>).

4.1 CARACTERIZAÇÃO SOCIOECONÔMICO, DEMOGRÁFICO, AMBIENTAL E CULTURAL DOS PACIENTES

Foram aplicados 53 questionários no ato da coleta da amostra fecal dos pacientes provenientes de quatro comunidades ribeirinhas (Figura 11) da Amazônia.

Figura 11: Distribuição dos números de questionários aplicados por localidade.



Fonte: elaborado pelo autor.

Os questionários tinham como objetivo coletar informações quanto a gênero, idade, localização e tipo de moradia, números de residentes no domicílio, nível de escolaridade dos responsáveis, renda familiar, grupo étnico (cor), tratamento e consumo da água, hábitos de higienização das mãos antes da refeição e após o uso do banheiro, o destino das fezes e do lixo doméstico, e as manifestações clínicas que levam a busca por atendimento nas Unidades Básicas de Saúde (UBS). Neste sentido, o questionário foi elaborado considerando expressões de fácil entendimento para população ribeirinha, em relação aos seus costumes, nas expressões utilizadas, nas designações das enfermidades, e nos sintomas clínicos (GAMA et al., 2018).

Tabela 2: Perfil socioeconômico, demográfico, ambiental e cultural por localidade.

		LOCALIDADES				TOTAL %
		A	B	C	D	
GÊNERO	Feminino	5	9	4	17	35 (66%)
	Masculino	5	7	4	2	18 (34%)
FAIXA ETÁRIA	0 – 12 anos	5	12	4	6	29 (51%)
	13 – 18 anos	2	1	0	2	5 (9%)
	19 – 59 anos	3	3	3	10	19 (36%)
	60 – 80 anos	0	0	1	1	2 (4%)
LOCALIZAÇÃO DA MORADIA	Margem do rio:	10	0	1	11	22 (42%)
	Terra firme:	0	16	7	8	31 (58%)
TIPO DE MORADIA	Alvenaria:	0	8	0	3	11 (21%)
	Madeira:	10	6	8	15	39 (74%)
	Mista:	0	2	0	1	3 (6%)
RESIDENTES NO DOMICÍLIO	1-5 Pessoas:	7	10	2	9	28 (53%)
	6-10 Pessoas:	3	6	6	10	25 (47%)
ESCOLARIDADE DOS RESPONSÁVEIS	Sem escolaridade:	0	0	3	2	5 (9%)
	Ensino fundamental:	0	5	4	14	23 (43%)
	Ensino médio:	10	11	1	3	25 (47%)
RENDA FAMILIAR	Até 1 salário:	0	16	8	19	43 (81%)
	1 a 2 salários:	10	0	0	0	10 (19%)
GRUPO ÉTNICO (COR)	Pardo:	10	8	8	16	42 (79%)
	Preta:	0	1	0	0	1 (2%)
	Branca:	0	7	0	3	10 (19%)
TRATAMENTO DA ÁGUA	Hipoclorito e coada:	10	6	8	19	43 (81%)
	Encanada:	0	10	0	0	10 (19%)
	Fervida ou Filtrada:	0	0	0	0	0 (0%)
ÁGUA PARA CONSUMO	Rio:	10	0	0	11	21 (40%)
	Poço:	0	5	0	8	13 (25%)
	Encanada:	0	11	0	0	11 (21%)
	Encanada / rio:	0	0	8	0	8 (15%)
LAVAGEM DAS MÃOS ANTES DA REFEIÇÃO	Sim	6	5	4	16	31 (58%)
	Não	0	5	2	0	7 (13%)
	As vezes	4	6	2	3	15 (28%)
LAVAGEM DAS MÃOS APÓS USAR O BANHEIRO	Sim	10	8	4	18	40 (75%)
	Não	0	3	2	0	5 (9%)
	As vezes	0	5	2	1	8 (15%)
DESTINO DAS FEZES	Fossa séptica:	0	16	7	11	34 (64%)
	Fossa séptica/ rio:	10	0	1	8	19 (36%)
	Vala	0	0	0	0	0 (0%)
DESTINO DO LIXO	Coleta:	0	16	8	13	37 (70%)
	Queimado/ enterrado	10	0	0	6	16 (30%)
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	Diarreia:	2	5	4	3	14 (26%)
	Náuseas:	3	0	0	1	4 (8%)
	Dores de barriga:	0	10	4	15	29 (55%)
	Dores abdominais:	5	1	0	0	6 (11%)

Legenda: A= Matapi; B= Delta do Matapi; C= Elesbão e D= Anauerapucu

As comunidades ribeirinhas da Amazônia exercem em seus costumes e tradições uma relação harmoniosa com o meio ambiente, uma realidade cultural e ambiental totalmente diferente de outras regiões do Brasil, as moradias, a relação com os rios, alimentação, as crenças e misticismo. O rio é um referencial que determina o ritmo de vida destas populações, seja na produção e provisão de alimentos, no fluxo de pessoas, e informações com o meio urbano (DOMINGOS; GONÇALVES, 2019; GUIMARÃES et al., 2020; REIS et al., 2012).

Em comum acordo com as exigências éticas, participaram deste estudo 53 pacientes, 66% eram do gênero feminino e 34% do gênero masculino. É justificável que a maioria dos entrevistados serem do gênero feminino, além de serem a maioria da população brasileira, no âmbito familiar, as mulheres são as mais cuidadosas com a saúde dos filhos e dos demais familiares, passando a exercer a função de guardiã do bem estar de todos, principalmente das crianças na busca de atendimento médico, na vacinação, nos exames de rotina, e no cumprimento rígido do tratamento com remédios (GUTIERREZ; MINAYO, 2009).

O estudo não se limitou em apenas uma faixa etária, desta forma, realizou-se abordagens de todos aqueles que buscaram atendimento de saúde no período dos meses de julho a setembro de 2019. A maioria das abordagens e coletas foram de crianças de 0 a 12 anos representando 51% dos pacientes. O maior número de crianças assistidas nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) com sintomas gastrointestinais é explicada pelo fato da diarreia ser predominante na infância, principalmente nos cinco primeiros anos de vida, apesar da queda na mortalidade infantil ocasionada por diarreia, a doença continua sendo um desafio de saúde pública em países em desenvolvimento (MARA et al., 2010).

A maioria dos pacientes residem em moradias localizadas em terra firme o que corresponde a 58%, e 42% residem em moradias localizadas a margem de rios, em destaque para os dez pacientes da localidade do rio Matapi, que residem a margem de rio. Quanto ao tipo de moradia, 39% residem em moradias de madeiras.

O espaço que abrange as residências dos pacientes é formada principalmente por várzea, e, portanto a maior parte da população encontra-se dispostas sobre a área inundável diariamente. Possuem características comuns de áreas periféricas, pois as condições habitacionais são extremamente carentes de infraestrutura e com o mínimo de serviços públicos (TAKAMATSU, 2013). Nestas comunidades, a ocupação é predominantemente em palafitas, havendo poucas edificações de alvenaria em áreas aterradas. A ocupação urbana desorganizada cresce e com ela a supressão vegetal e a

geração de resíduos poluentes que afetam o curso hídrico (SATHLER; MONTE-MÓR; CARVALHO, 2009).

O nível de escolaridade da maioria dos pacientes e de seus responsáveis é de 47% com o Ensino médio concluído. Refletindo nos avanços dos últimos anos, onde a educação no Estado do Amapá disparou quantitativamente, ocorrendo investimentos na formação de professores, criação de novas escolas e transporte escolar fluvial, apesar do baixo nível de analfabetismo do país de 6,8%, no Amapá ainda é um desafio a sua erradicação, principalmente na população negra (GAMA et al., 2018; IBGE, 2018; SÁ; FERREIRA, 2020).

A renda familiar circula em torno extrativismo e em todas comunidades estudadas os benefícios do governo federal e estadual (bolsa família, renda para viver melhor, bolsa verde e entre outros) é a principal fonte de renda, fato que contribui para a baixa renda da maioria das famílias (GOMES; SILVA; MEDEIROS, 2015) . No Elesbão a pesca do camarão é a principal atividade, seguida de perto pelo comércio e pela carpintaria naval (MACHADO et al., 2010). No geral, predomina nas comunidades ribeirinhas a renda familiar mensal *per capita* baixa, de aproximadamente 30% do salário mínimo (GAMA et al., 2018).

O difícil acesso a água potável nestas localidades, torna um fator predominante para o nível de contaminação por agentes infecciosos, 40% dos pacientes relataram consumir água diretamente dos rios, 25% consomem água de poços amazonas, 21% consomem água encanada, e 15% consomem água encanada e na ausência recorrem as águas dos rios. Quanto ao tratamento das águas dos rios e dos poços amazonas 81% realizam o tratamento da água coada e em seguida colocam hipoclorito, 19% usam água encanada tratada pela Companhia de água e esgoto do Amapá (CAESA). O uso das águas dos rios nas atividades domésticas e higiene pessoal representam um risco à saúde da população devido à presença de diferentes patógenos que são veiculados pela água contaminada (SILVA et al., 2014).

Perguntou-se sobre os hábitos de lavar as mãos antes das refeições, 58% responderam lavar as mãos com frequência, 28% responderam lavar as mãos as vezes antes das refeições; e 13% não possuem o habito. Quanto a lavagem das mãos após o uso do banheiro 75% afirmaram lavar sim as mãos todas as vezes que utilizam o banheiro, 15% não lavam sempre as mãos ao saírem do banheiro, e 9% não lavam as mãos. A ausência de práticas de higienização costuma estar associada a proliferação de agentes infecciosos, ocasionando uma maior incidência de diarreia infantil (ELLWANGER et al., 2021).

Quanto ao destino das fezes 64% dos pacientes relataram possuir fossa séptica em seus domicílios, e 36% relataram possuir fossa séptica, porém, sofre influência direta da

maré dos rios. Quanto ao destino do lixo doméstico 70% afirmaram possuir equipes de coletas de lixo regularmente, e 30% queimam e enterram o lixo doméstico. A real situação de saneamento básico relacionado ao destino dos dejetos humanos, torna-se uma preocupação e um fator determinante para o agravamento de doenças infecto contagiantes em comunidades ribeirinhas da Amazônia, geralmente os dejetos são lançados diretamente aos rios, através de fossas e valas inadequadas, onde sofrem influência direta da maré dos rios (SILVA et al., 2014).

Sendo assim, a disposição de dejetos humanos em áreas peridomiciliares e próximas às nascentes, o consumo de água sem tratamento, o grau de contaminação das águas por coliformes, contribuem diretamente para a disseminação de agentes patogênicos (RIOS et al., 2007).

Em relação aos resíduos sólidos, os pacientes residentes a margem dos rios foram os que mais relataram dificuldades com o destino correto dos resíduos sólidos. Na ausência de coleta de lixo, os moradores improvisam meios de descarte, como na maioria das vezes queimam, enterram, ou simplesmente acumulam em uma área distante, nos rios ou nos igarapés (RIOS et al., 2007). Essas comunidades apresentam condições de saneamento básico extremamente precárias, tendo em vista que as eliminações fisiológicas e demais dejetos domésticos são depositados a céu aberto ou sobre o rio (MACHADO et al., 2010).

A ausência de saneamento ambiental representa 19% das causas de doenças humanas no mundo (PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014). Portanto, o saneamento ambiental é, um dos fatores mais eficazes e robustos para o controle e prevenção de doenças infecciosas, minimizando inúmeros problemas de saúde pública e trazendo resultados econômicos significativos para a sociedade (MARA et al., 2010).

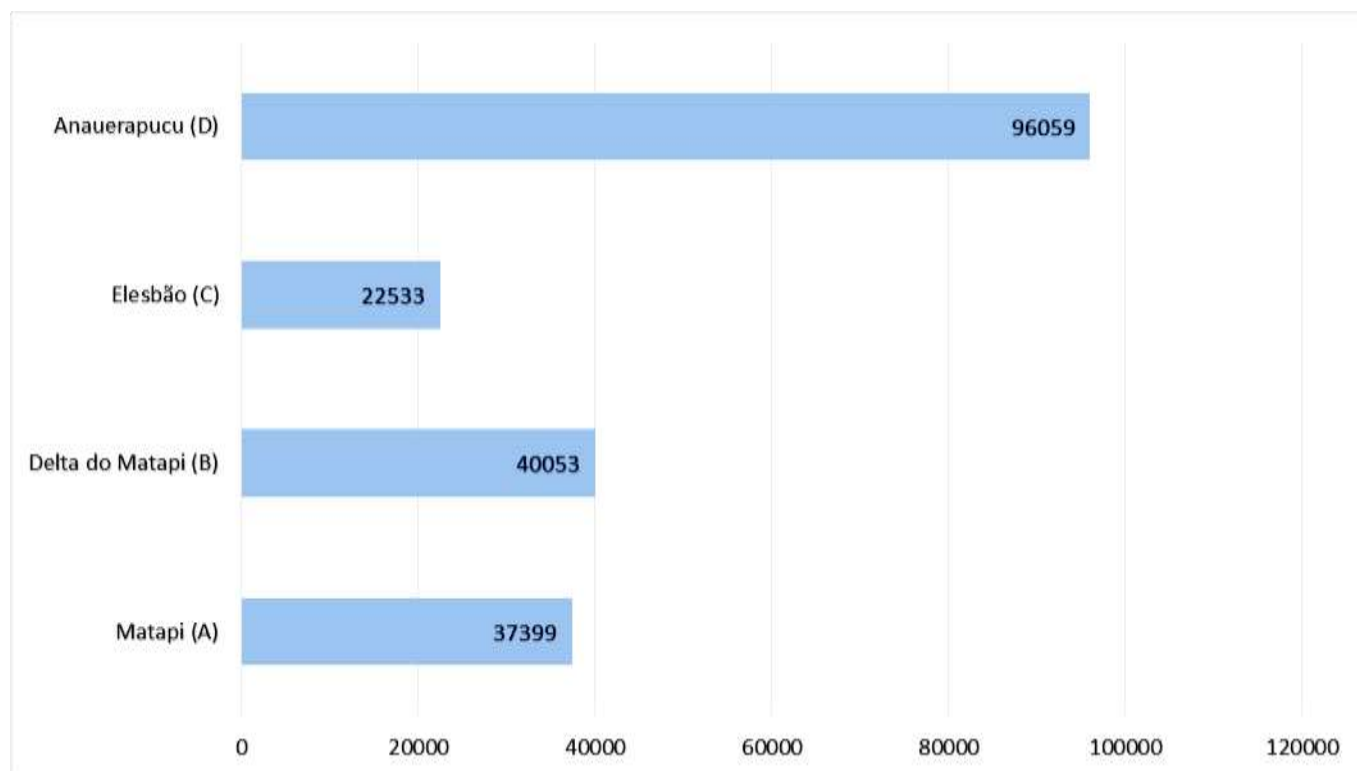
Esses dados visam compreender a relação das condições socioeconômicas, demográficas, ambiental e cultural com as infecções virais detectadas em cada amostra, desta forma, é possível compreender os fatores que implicam na ocorrência de diarreia nessas localidades ribeirinhas (DELWART, 2013; LIU et al., 2019). Sendo assim, é fundamental compara-los epidemiologicamente, especialmente os fatores para a idade, proveniência geográfica e, exposição geral a vírus. (LI; DELWART, 2011).

4.2 DIVERSIDADE VIRAL

Foram sequenciadas 50 amostras fecais por meio do Sequenciamento de Segunda geração (NGS) utilizando a técnica de metagenômica viral. Apenas três amostras (amostras nº24, nº43 e nº50) não foram viáveis para o estudo. Um total de 227.502 leituras de sequências de famílias virais (*reads*) foram identificadas, após o pipeline com alta qualidade de alinhamento com as sequências depositadas no BLAST. Os *singlets* e *contigs* gerados no sequenciamento foram analisados submetidos ao BLASTx para verificação da similaridade da proteína de sequência traduzida com todas as proteínas virais no *RefSeq* vírus do *Genbank*.

196.044 hits (melhores alinhamentos obtidos após a aplicação do *pipeline* ao *dataset*, ou conjunto de dados gerados no sequenciamento) foram selecionados após serem desconsideradas alinhamentos abaixo de 40 leituras de acordo com o estudo de Siqueira et al. (2018). Desta forma, é apresentado na figura 12 o número de sequências divididas por comunidades.

Figura 12: número de leituras de sequências divididas entre as quatro comunidades em estudo.



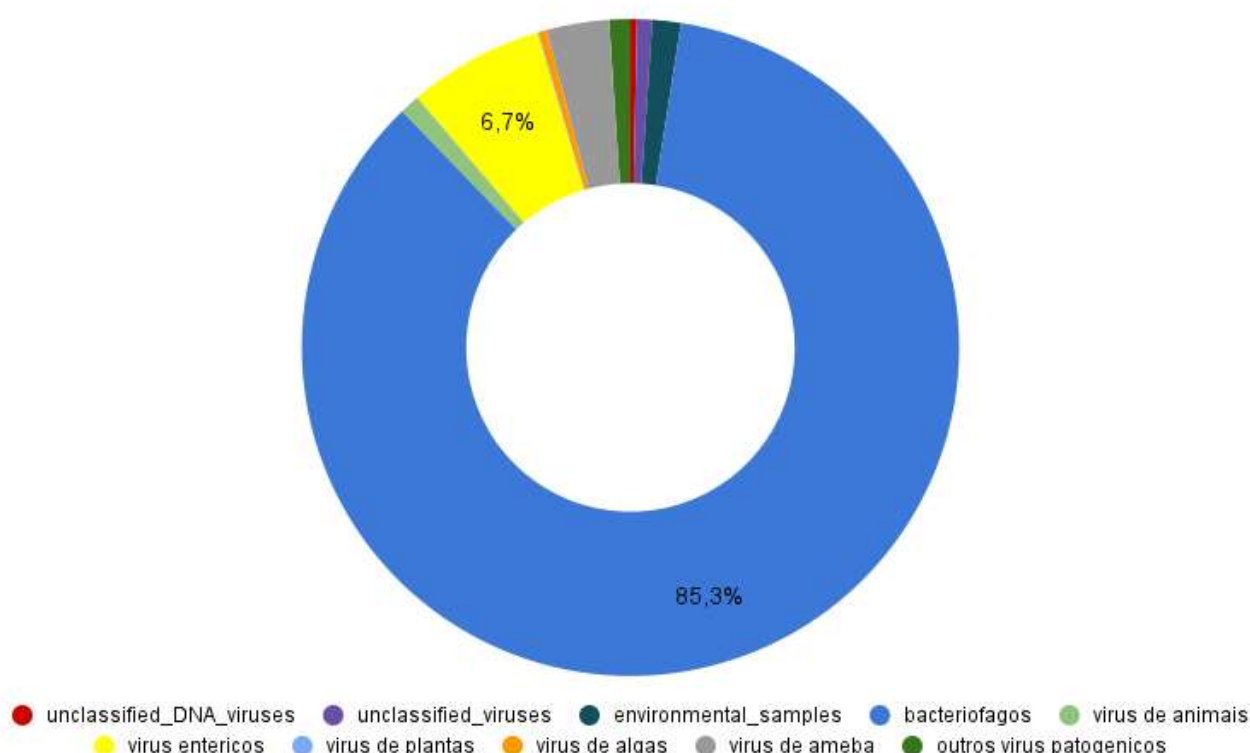
Fonte: elaborado pelo autor.

Foram sequenciadas 10 amostras dos pacientes residentes a margem do rio Matapi, apresentando 37.399 similaridades com sequências do banco de dados *Genbank*. Assim, como 15 amostras sequenciadas do Delta do Matapi resultaram em 40.053 sequências, 7

amostras do Elesbão com 22.533 sequências, e as 18 amostras do Anauerapucu com 96.059 sequências.

A diversidade viral encontrada nas 50 amostras é composta em sua maioria por bacteriófagos (85,30%), vírus entéricos (6,70%), vírus de ameba (3,10%), environmental samples (1,40%), vírus de animais (1,00%), outros vírus patogênicos em humano (1,00%), unclassified viruses (0,70%), vírus de algas (0,40%), unclassified DNA viruses (0,30%) e vírus de plantas (0,10%). A figura 13 ilustra melhor essa divisão dos vírus quanto ao seu hospedeiro.

Figura 13: A porcentagem de sequências de todas as 50 bibliotecas categorizadas quanto ao seu hospedeiro.



Fonte: elaborado pelo autor.

Ao todo foram identificadas 20 famílias virais, destas, apenas nove famílias são conhecidas por infectar vertebrados, o maior número de leituras pertence as famílias *Astroviridae* (5.013), *Picornaviridae* (4.556), *Caliciviridae* (3.492), *Togaviridae* (1.961), *Circoviridae* (1.441), e em menor número de leituras as famílias *Poxviridae* (324), *Polyomaviridae* (124), *Flaviviridae* (80), e *Anelloviridae* (40). A Tabela 3 apresenta as leituras das 20 famílias de vírus, nas quatro localidades.

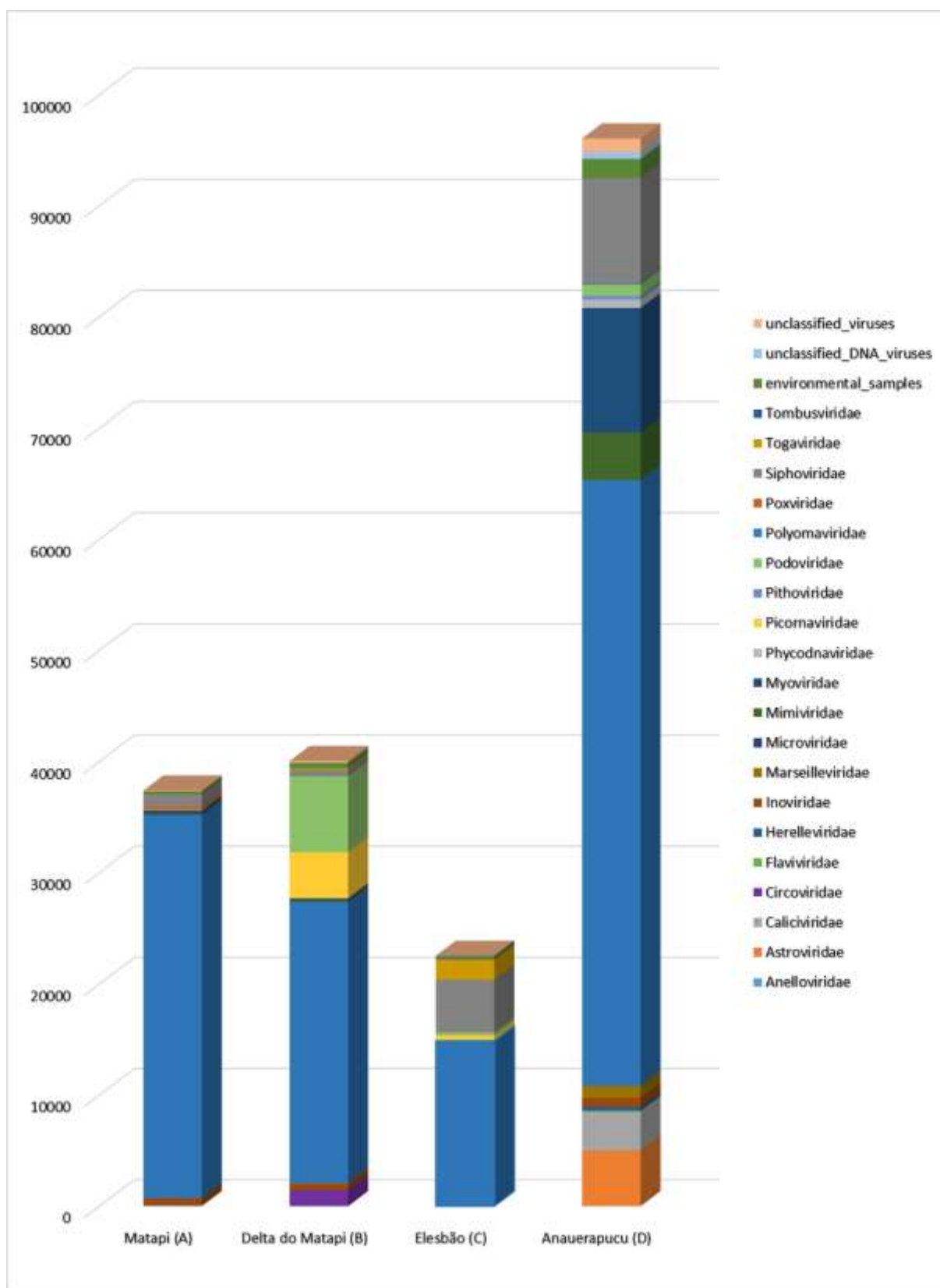
Tabela 3: As famílias virais e o número de sequências divididas por ocorrência nas quatro localidades.

	Famílias	Localidades			
		A	B	C	D
1.	<i>Anelloviridae</i>	40	0	0	0
2.	<i>Astroviridae</i>	0	0	0	5.013
3.	<i>Caliciviridae</i>	0	0	0	3.492
4.	<i>Circoviridae</i>	0	1.441	0	0
5.	<i>Flaviviridae</i>	0	0	0	80
6.	<i>Herelleviridae</i>	0	0	0	358
7.	<i>Inoviridae</i>	678	554	0	820
8.	<i>Marseilleviridae</i>	0	64	0	1.071
9.	<i>Microviridae</i>	34.445	25.279	14.890	54.488
10.	<i>Mimiviridae</i>	107	136	51	4.283
11.	<i>Myoviridae</i>	320	218	0	11.205
12.	<i>Phycodnaviridae</i>	43	0	0	752
13.	<i>Picornaviridae</i>	0	4.148	408	0
14.	<i>Pithoviridae</i>	0	0	0	318
15.	<i>Podoviridae</i>	0	6.823	280	1.039
16.	<i>Polyomaviridae</i>	0	0	0	124
17.	<i>Poxviridae</i>	282	0	0	42
18.	<i>Siphoviridae</i>	1.122	577	4.747	9.399
19.	<i>Togaviridae</i>	0	136	1.825	0
20.	<i>Tombusviridae</i>	0	0	118	0
21.	environmental_samples	286	511	214	1.734
22.	unclassified_DNA_viruses	0	0	0	622
23.	unclassified_viruses	76	166	0	1.219

Legenda: A= Matapi; B= Delta do Matapi; C= Elesbão e D= Anauerapucu.

Os maiores números de sequências foram registrados para vírus que infectam bactérias, conhecidos como bacteriófagos ou simplesmente fagos, com as seguintes famílias: *Microviridae* (129.102), *Siphoviridae* (15.845), *Myoviridae* (11.743), *Podoviridae* (8.142), *Inoviridae* (2.052) e em menor número de sequências a família *Herelleviridae* (358). As famílias virais detectadas estão ilustradas na figura 14, distribuídas em cada localidade.

Figura 14: Representação gráfica das 20 famílias detectadas por similaridade no *Genbank*, percentual dividido nas quatro comunidades.



Legenda: Na figura podemos observar em X as diferentes localidades avaliadas e em Y o número de sequências/*reads* das diferentes famílias virais identificadas após a análise do *pipeline*.

A abordagem metagenômica revolucionou e continua ampliando o campo de compreensão da diversidade viral que compõe o viroma do intestino humano, permitindo a vigilância sob futuras epidemias, a detecção de vírus emergentes e de novos vírus. A contínua exposição viral, implica na troca de vírus entre espécies hospedeiras, proporciona o surgimento de vírus emergentes a partir da exposição zoonótica de patógenos, implicando em uma constante vigilância de surtos. É notório, a importância da caracterização de vírus que replicam-se na flora intestinal, a sua transmissão e mutações, para a melhor compreensão da epidemiologia da ocorrência da diarreia (DELWART, 2013).

Em estudos anteriores, a aplicação da técnica metagenômica apresentou um potencial de definir o desconhecido e vasto viroma do intestino humano, permitindo investigações sobre diversos agentes virais, diretamente relacionados com episódios da diarreia aguda humana.

Com este intuito, Finkbeiner et al (2008) analisaram o viroma de 12 amostras fecais de crianças que anteriormente foram submetidas a exames convencionais como : Imunoensaios Enzimáticos de Rotina (EIA), ensaios de cultura para rotavírus, adenovírus e patógenos bacterianos, parasitas por microscopia e teste de antígenos. Desta forma, ao aplicar quantidades mínimas de fezes, purificação mínima da amostra, e sequenciamento limitado, denominado pelo autor como 'sequenciamento de micro-massa', obteve-se resultados para vírus entéricos conhecidos, co - infecções virais e novos vírus, contrariando os resultados negativos das análises convencionais. Foram detectados patógenos entéricos comuns, rotavírus, calicivírus, adenovírus e astrovírus, e novas sequências de picobirnavírus, picornavírus, anellovírus e norovírus. Permitindo compreender a atuação dos vírus entéricos, e de traçar medidas terapêuticas e de prevenção.

Com os mesmos objetivos, Siqueira et al (2018) aplicaram a técnica de metagenômica em amostras de fezes coletadas de 80 crianças divididas em quatro locais da Venezuela, um grupo da zona urbana e os outros três grupos em aldeias. O sequenciamento genômico e as análises por similaridades no banco de dados, foram detectados sequências de 23 famílias virais conhecidos por infectar vertebrados, como as famílias *Picornaviridae*, *Caliciviridae*, *Circoviridae*, *Anelloviridae*, *Astroviridae* e *Reoviridae*. Dentre essas, foram detectados nas fezes de todos os quatro locais amostrados, famílias de vírus humanos entéricos e outros vírus eucarióticos de origem desconhecida.

Em outro estudo realizado na Venezuela em 2003, em um número de 480 amostras de fezes coletadas de crianças menores de 5 anos de idade com gastroenterite foram detectadas em maior frequência 21% o rotavírus, 13% norovírus, 5% adenovírus, 2,5%

sapovírus e 1,5% astrovírus a partir do sequenciamento na plataforma ABI Prism 377 (Aplicado Biosystems, Carlsbad, CA). O estudo alertou para vigilância do rotavírus e principalmente de outros vírus que estão diretamente relacionados a diarreia, e que atinge os mais vulneráveis na sociedade (GONZÁLEZ; LIPRANDI; LUDERT, 2011).

Neste sentido, os estudos integram resultados semelhantes que dialogam com este estudo, embasam a importância do viroma para a compreensão dos vírus entéricos, e buscam compreender os fatores externos que contribuem para infecções gastrointestinais, possibilitando a integração de novos conhecimentos relacionados a diversidade de vírus e sua caracterização funcional (DÁVILA-RAMOS et al., 2019; SIQUEIRA et al., 2018). É fundamental que sejam realizadas investigações sistemáticas para a descoberta da diversidade que compõem o intestino humano (HOLTZ et al., 2008).

4.3 DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS

As sequências de vírus entéricos foram detectadas em três amostras de distintas localidades, o que corresponde a 6,70 % das sequências detectadas. As três amostras foram coletadas de crianças do sexo feminino, ente a faixa etária de 6 a 18 meses, que apresentavam um quadro grave de diarreia aguda. As condições socioeconômica das três crianças se assemelham, e todos os responsáveis buscaram atendimento médico com a gravidade do quadro clínico que se encontravam as crianças.

A seguir, na tabela 4 é apresentada as localidades da coleta das amostras, taxonomia dos vírus considerados entéricos, e o número de sequências detectadas.

Tabela 4: Amostras e localidades, onde foram detectadas diferentes espécies de vírus entéricos e o número de sequências.

Localidades	Família	Gênero	Espécie	Sequências
Delta do Matapi Amostra nº 13	<i>Picornaviridae</i>	<i>Salivirus</i>	<i>Human_salivirus</i>	1167
			<i>Salivirus_A</i>	1219
			<i>Salivirus_FHB</i>	908
			<i>Salivirus_sewage_Bangkok</i>	616
			<i>Salivirus_sp.</i>	238
Elesbão Amostra nº 21	<i>Picornaviridae</i>	<i>Salivirus</i>	<i>Human_salivirus</i>	89
			<i>Salivirus_A</i>	150
			<i>Salivirus_FHB</i>	115
			<i>Salivirus_sewage_Bangkok</i>	54
Anauerapucu Amostra nº 51	<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	<i>Mamastrovirus_1</i>	4426
			<i>Human_astrovirus</i>	587
	<i>Caliciviridae</i>	<i>Sapovirus</i>	<i>Sapporo_virus</i>	3492

4.3.1 *Astroviridae*

As sequências da família *Astroviridae* foram detectadas na amostra nº 51, de uma criança do gênero feminino, de 18 meses que apresentava uma infecção gastrointestinal. Foram detectadas 5.013 sequências da família *Astroviridae*, das espécies *Mamastrovirus1*, conhecidos por infectar humanos.

Astrovírus humanos (HAstV) são pequenos vírus de RNA de fita simples de sentido positivo sem envelope. Por apresentar uma variedade de hospedeiros, foram divididos em dois gêneros principais; *Avastrovirus* e *Mamastrovirus*, classificados de acordo com capacidade de infectar espécies de aves e mamíferos. *Mamastrovirus* inclui HAstVs que são classificados na ordem de descoberta, oito sorotipos, representando a principal causa de diarreia em crianças, principalmente aquelas menores de dois anos, idosos e pessoas imunocomprometidas (JEONG; JEONG; CHEON, 2012; JOHNSON et al., 2017; PÉROT; LECUIT; ELOIT, 2017).

Segundo o Comitê internacional para a Taxonomia de Vírus (ICTV), atualmente, as espécies de *mamastrovirus* são baseadas nos hospedeiros dos quais foram isoladas, o que não corresponde aos avanços tecnológicos da biologia molecular. Desta forma, a classificação das espécies de *mamastrovirus* está sendo reformulada de acordo com a análise filogenética (ICTV, 2011; KAPOOR et al., 2009).

A detecção de HAstV na amostra nº 51, confirma o estado clínico que o paciente se encontrava com mais de dois dias de diarreia aquosa, dor de cabeça, febre e dores abdominais. Estudos semelhantes apontam para incidência da infecção por astrovírus em até 10% dos casos de diarreia não bacteriana (FINKBEINER; KIRKWOOD; WANG, 2008).

A detecção de novos HAstV divergentes continuam surgindo a partir dos avanços das técnicas de biologia molecular. Foram Identificados em fezes humanas, variantes das duas espécies conhecidas de HAstV e, três novas espécies baseado em critérios de distância genética (KAPOOR et al., 2009). Em 2008, após um surto de doença gastrointestinal em uma creche na Virgínia, amostras de seis pacientes passaram por uma extensa investigação, além das várias sequências com identidade limitada para astrovírus conhecidos, foi identificado através da análise filogenética, um novo astrovírus divergente dos descritos anteriormente denominado astrovírus VA1 (FINKBEINER et al., 2009).

No estado de Roraima, em um estudo realizado em 2016 e 2017, relatou a primeira ocorrência de astrovírus humano MLB2 no Brasil, detectado em Cento e setenta amostras fecais de crianças menores de 5 anos com diarreia, internadas em um hospital da cidade Boa Vista (OLIVARES et al., 2020). Em um outro estudo, foram identificados dois

novos astrovírus MLB3 e VA4, em amostras de fezes de crianças coletadas na Índia e no Nepal (JIANG et al., 2013).

A infecção por HAsV é associada ao consumo de água diretamente de rios, e da sua utilização nos afazeres domésticos, principalmente na preparação e manipulação de alimentos. A transmissão ocorre preferencialmente pela via fecal-oral, podendo ter uma relação direta com as condições sócio ambientais que vive o paciente, nas práticas incorretas da higienização dos alimentos e no consumo de água, apesar dos convencionais métodos de tratamento de águas residuais, não é garantida a eliminação de patógenos virais (BOSCH; PINTO; GUIX, 2014).

4.3.2 *Caliciviridae*

Concomitantemente, na amostra nº 51 foi detectada sequências da família *Caliciviridae*. 3.492 leituras da espécie *Sapporo vírus*, membro do gênero *Sapovirus*. A contaminação por sapovirus está associado a surtos de gastroenterite aguda transmitidos por alimentos e água em todo o mundo (KUMTHIP; KHAMRIN; MANEEKARN, 2018).

A família *Caliciviridae* é composta por um grupo geneticamente diverso de vírus de RNA de fita simples, medem de 27 a 40 nm, e não possuem envelope. A taxonomia dos calicivirus inclui sete gêneros que infectam mamíferos: *Lagovirus*, *Norovirus*, *Nebovirus*, *Recovirus*, *Sapovirus*, *Valovirus* e *Vesivirus*. Os gêneros *Bavovirus* e *Nacovirus* infectam aves, e os gêneros *Minovirus* e *Salovirus* que infectam peixes. O gênero *Norovirus* e *Sapovirus* estão diretamente relacionados a infecções que causam gastroenterite aguda em seres humanos (DESSELBERGER, 2017; TATUSOV et al., 2021; VINJÉ et al., 2019).

Sapovírus (HSaVs) são classificados em cinco genogrupos e pelo menos 17 genótipos, GI, GII e GIV, sendo o genogrupo GI o mais prevalente. São responsáveis pela ocorrência da diarreia aguda em humanos de todas as idades com casos pontuais, de gravidade leve, porém podendo levar a hospitalizações de crianças, imunocomprometidos, ou idosos, é uma das causas constantes de surtos, tornando –se um grave problema de saúde pública em todo o mundo (OKA et al., 2015; TORNER et al., 2016).

Na Região Norte do Brasil, foram analisadas oito amostras fecais de pacientes que apresentavam diarreia aguda, vômito e febre. Foi divulgado os resultados quanto a montagem de sequências genômicas completas de seis cepas Sapovírus humanos (HSaVs) GI.2 e duas GI.3 após a aplicação minuciosa do protocolo de metagenômica viral, análises de bioinformática e filogenéticas (CILLI et al., 2019). No Centro Oeste do Brasil, amostras fecais 56 crianças entre 6 e 55 meses de idade que frequentavam uma creche

foram submetidas ao Sequenciamento genômico e análise filogenética, resultando em 25 amostras (4,6%) positivas para sapovirus (OLIVEIRA et al., 2014).

Com o objetivo de aumentar o número de genomas de sapovírus completos, foram analisados amostras fecais positivos de sapovírus obtidos de surtos ou casos esporádicos de diarreia aguda coletados entre 2010 e 2016, após serem submetidas ao sequenciamento dos genomas, obteve-se 68 cepas completas de quatro países diferentes, incluindo genótipos raros, possibilitando o entendimento da epidemiologia molecular dos sapovirus (DIEZ-VALCARCE et al., 2018).

4.3.3 *Picornaviridae*

Em duas localidades distintas foram detectadas 4.556 sequências com similaridades com as espécies pertencentes ao gênero *salivirus*, da família *Picornaviridae*. A amostra nº 13 é de uma paciente criança de seis meses de idade que apresentava um grave quadro de diarreia aguda, foram detectadas 4.148 de leituras para o gênero *Salivirus*. Na amostra de nº 21 é de uma paciente de nove meses de idade, que passou por hospitalização para o tratamento de uma grave diarreia aguda, sendo detectadas 408 sequências de *salivirus*.

A família *Picornaviridae* é considerado um amplo e diversificado grupo que ocasionam em humanos doenças agudas e registros de infecção em outros mamíferos, pássaros, répteis, anfíbios e peixes (NIX et al., 2013). São pequenos vírus sem envelope com genomas de RNA de 6,7 a 10,1 kb. Segundo o relatório ICTV, a família *Picornaviridae* é constituída por 147 espécies distribuídas em 63 gêneros, estando em constante modificação com a classificação de novos vírus. Na maioria dos picornavírus a contaminação ocorre pelas vias fecal-oral ou respiratória (KUHN et al., 2020; LEWIS-ROGERS; CRANDALL, 2010; ZELL et al., 2017).

Entre os gêneros infecciosos para humanos, os estudos apontam o *Enterovírus*, *Hepatovírus*, *Parecovírus*, *Kobuvírus*, *Cosavirus* e *Cardiovírus*. Ao gênero *Salivirus*, os estudos associam a sua incidência a diarreia aguda (PEI et al., 2016). Até o momento, o gênero possui duas espécies membros: *Salivirus A1* (SaV-A1) e *Salivirus A2* (SaV-A2) (ICTV, 2020).

Sendo assim, as espécies de *Salivirus* foram detectadas em amostras fecais diarreica nos Estados Unidos, Austrália, Nigéria, China, Hong Kong, Coreia do Sul e Alemanha. Baseados em estudos de epidemiologia molecular e sorológica foram atribuídos aos *salivirus* a incidência de gastroenterite aguda (YU et al., 2015).

Na Guatemala, foi detectada um *salivirus* divergente em uma amostra fecal de uma criança com infecção gastrointestinal que testou positiva para norovirus. Sendo assim,

aplicou-se o protocolo de metagenômica viral, possibilitando a montagem do genoma de salivírus quase completo a partir de 34.983 leituras (NG et al., 2016). Em outro estudo realizado no Rio de Janeiro foram submetidas a sequenciamento genético amostras de fezes coletadas de 1998 a 2007 e de 2010 a 2012, resultando 10 de 598 amostras estudadas, representando um percentual de 1,7% de amostras positivas para salivírus, sem nenhuma outra ocorrência de vírus entéricos, atribuiu o quadro clínico destes pacientes a incidência de Salivírus (SANTOS et al., 2015).

Foram detectadas sequências divergentes de salivírus, também conhecido como klassevírus, em nove amostras fecais de crianças com diarreia que foram hospitalizadas durante os anos de 2008 e 2009 em Xangai, na China. O isolado do novo salivírus mostrou 95% de identidade com registros da Nigéria, indicando a disseminação do vírus associado a diarreia aguda pelo globo terrestre (SHAN et al., 2010). Em 2013, relatou-se em Shenzhen, na China, o primeiro caso de salivírus humano em amostras respiratórias de uma criança, resultados obtidos apontam similaridades com a cepa *Salivirus A* de Xangai (PEI et al., 2016).

Portanto, este estudo marca o primeiro registro de ocorrência do salivírus em amostras fecais de diarreia na Amazônia Ocidental, passando a integrar uma gama de pesquisas que visam monitorar a incidência e a epidemiologia de vírus emergentes em diferentes pontos do planeta (WOOLHOUSE et al., 2012).

4.4 DETECÇÃO DE OUTROS VÍRUS

4.4.1 vírus patogênicos em Humanos

Dentre outras famílias de vírus detectadas utilizando a abordagem metagenômica, detectou-se membros das famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Polyomaviridae*.

A amostra nº 37 pertencente a uma mulher adulta de 26 anos, moradora da localidade D, detectou-se 80 sequências da família *Flaviviridae*. Trata-se da espécie *Hepacivirus C* ou hepatite C (HCV), diferente da hepatite A e E, não há relatos de transmissão pelas vias oral e fecal. O vírus da HCV é transmitido entre humanos por exposição parenteral a sangue e objetos contaminados, como por exemplo seringas. A sua maior prevalência é no plasma humano. (DELWART, 2013; EASTERBROOK et al., 2017; LI; DELWART, 2011).

Em duas amostras de fezes de crianças de distintas localidades (B e C) foram detectadas o vírus Chikungunya. A amostra nº 41 apresentou 136 sequências enquanto a amostra nº 27 foram detectadas 1.825 sequências. Entre vários sintomas que atingem os

pacientes diagnosticados com Chikungunya; febre e dores nas articulações, erupção cutânea, vômito e alteração da bioquímica hepática, a diarreia não é um sintoma comum. Em um estudo realizado na cidade de Dhaka, capital de Bangladesh dos sete casos confirmados de chikungunya, três pacientes apresentaram sintomas gastrointestinais (RAHIM; UDDIN, 2017). Em condições inflamatórias os vírus tendem a serem eliminados nas fezes em sintomas de diarreia (ZHANG et al., 2005).

Na família *Polyomaviridae* foi detectado 124 leituras da espécie *Poliomavírus humano 1*, em uma criança de três anos residente na localidade D. A eliminação de poliomavírus nas fezes foram detectadas em um estudo que objetivava confirmar a presença do vírus em crianças menores de 13 meses. Das 39 amostras de pacientes, 25 foram positivas para poliomavirus (VANCHIERE et al., 2016). O vírus também foi detectado na amostra fecal de uma criança na Venezuela (SIQUEIRA et al., 2018). Na infância, a infecção é considerada leve, ao contrário dos pacientes imunossuprimidos, a doença continua sendo uma preocupação (PINTO; DOBSON, 2014).

4.4.2 Vírus de animais

As famílias *Circoviridae* e *Anelloviridae* são predominantemente vírus de animais, que possuem genomas circulares de cadeia simples de DNA. O ICTV ratificou em 2016 o 9º relatório, reclassificando o gênero *Gyrovirus* da família *Circoviridae* para *Anelloviridae*, por apresentar vírus de uma linhagem separada de replicons de ssDNA com base em características genômicas e estruturais (ROSARIO et al., 2017).

Este estudo identificou na amostra nº 9 de uma criança de 12 anos, do sexo masculino, residente a margem do rio (localidade A) 40 sequências com similaridades com o vírus da anemia da galinha, espécie de ocorrência mundial, pertencente ao gênero *Gyrovirus*, família *Anelloviridae*.

Na Tunísia, 180 amostras de fezes de diarreia divididas em dez *pools* foram sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq, o que resultou na montagem de genomas de duas outras espécies de girovírus de identidade de aminoácidos de 46-59% com aquelas dos girovírus anteriormente caracterizados, foram denominados GyV5 e GyV6 (PHAN et al., 2013). No Peru, também foram detectadas sequências do vírus da anemia de galinha, após a análise de 300 amostras de fezes com diarreia (ALTAN et al., 2017). A origem destes vírus nas fezes humanas é de provável fonte alimentar (PHAN et al., 2015).

Da família *Circoviridae* foram detectadas 1.441 sequências de três membros que ainda não foram classificados em um gênero. A coleta da amostra ocorreu na localidade B, e também é de uma criança de 11 anos do sexo masculino. A família *Circoviridae* abrange

dois gêneros, os *Circovirus* identificados apenas em vertebrados e os *Cyclovirus*, identificados em vertebrados e invertebrados. O percentual de 80% de identidade da sequência de nucleotídeos em todo o genoma determina as espécies para vírus da família *Circoviridae*. A sua incidência em fezes humanas é relacionada com a ingestão de alimentos, cuja a origem seja animal (BREITBART et al., 2017; LI et al., 2010).

Dois membros da família *Poxviridae* foram identificados em duas amostras (2 e 52) de distintas localidades (localidades A e D). As 282 sequências identificadas na amostra nº2, trata-se da espécie *Orf vírus*, pertencente ao gênero *Parapoxvirus*. Na amostra nº52, foi identificado 42 sequências relacionada a espécie *Anomala cúprea entomopoxvirus*, membro do gênero *Alphaentomopoxvirus*.

A família *Poxviridae* são grandes vírus de DNA de fita dupla em formato ovoide e realizam a replicação no citoplasma. A mesma família reuni outras doenças como: varíola, vacínia, varíola bovina e molusco contagioso. A espécie *Orf vírus* é o causador de infecção zoonótica de ovelhas e cabras. Em humanos, a infecção está relacionada ao contato direto com animais infectados ou fômites, manifestando em lesões cutâneas, a transmissão de humano para humano costuma ser rara (BERGQVIST; KURBAN; ABBAS, 2017; RAJKOMAR et al., 2016). O gênero *Alphaentomopoxvirus* inclui poxvírus de *Coleoptera*, como a espécie *Anomala cúprea entomopoxvirus* (MITSUHASHI; MIYAMOTO; WADA, 2014).

4.4.3 Vírus de Plantas e Algas

Os membros da família *Tombusviridae* conhecidas por infectarem plantas monocotiledôneas ou dicotiledôneas (SCHEETS et al., 2015) foram detectadas 118 sequências em uma amostra de paciente da localidade C. Anteriormente, foi detectado uma diversidade de vírus de plantas em amostras de fezes humanas, sendo atribuídas a ingestão de alimentos, não havendo evidências de replicação viral no trato gastrointestinal (ZHANG et al., 2005). Estas famílias podem ter sido identificadas por estarem nos alimentos na água ingeridos.

Membros da família *Phycodnaviridae* (1.643 sequências) foram detectados em amostras das localidades A e D, seus hospedeiros são algas de água doce ou algas marinhas em todo o mundo (DUNIGAN; FITZGERALD; VAN ETTEN, 2006; VAN ETTEN; DUNIGAN, 2012). Estudos futuros tendem a determinar quais desses vírus são capazes de se replicar no intestino humano (VICTORIA et al., 2009).

4.4.4 Vírus que infectam Protozoários (Ameba)

Os avanços com as técnicas de metagenômica viral proporcionou recentemente a identificação de vírus gigantes que infectam a ameba, isolados de diversos ambientes (pequenas porções de águas, rios, lagos, esgoto, sistema de refrigeração, sangue, plasma, secreções e fezes humana) em todo o mundo. Quanto a taxonomia, muitos membros ainda não foram devidamente categorizados, porém são filogeneticamente relacionados nas famílias *Mimiviridae*, *Marseilleviridae*, *Pithoviridae* (vírus de DNA sem classificação), gênero *Pandoravirus* (vírus de DNA sem classificação), novas descobertas visam compreender a biologia do grupo (ABERGEL; LEGENDRE; CLAVERIE, 2015; DORNAS et al., 2016; HALARY et al., 2016).

A família *Marseilleviridae* foram detectadas 1.899 sequências em amostras de pacientes das localidades B (amostras 39 e 42) e D (amostras 33, 37 e 52). Da família *Mimiviridae* foram detectadas 8.625 sequências em amostras de pacientes todas as localidades A (amostra 3), B (amostras 39 e 42), C (amostra 28) e D (amostras 36, 37, 46 e 52). A família *Pithoviridae* foram detectadas 645 sequências em amostras de pacientes da localidade D (amostras 33, 40 e 52).

Sequências de Mimivirus e Marseillevirus foram detectadas em fezes de um jovem no Senegal, confirmando a presença de vírus gigantes em humanos, e isolado em amostra de fezes, porém a patogenicidade desses vírus ainda é desconhecida (COLSON et al., 2013). Sequências de Mimivirus também foram detectadas em um estudo que buscava compreender o viroma intestinal de 12 crianças (FINKBEINER et al., 2008).

Não há registros que determine a função de seus hospedeiros quanto a ocorrência da diarreia. Apesar do pouco conhecimento sobre os vírus gigantes, evidencia - se a sua relevância para o meio ambiente e o seu papel em algumas doenças em animais e humanos (HALARY et al., 2016).

4.4.5 Detecção de vírus de DNA sem classificação

Entre os vírus sem classificação, é válido mencionar a detecção de CRESS vírus (223 sequências) em uma amostra da localidade D. Vários estudos detectaram o genoma deste grupo em fezes humanas, porém a sua origem celular em maior parte permanece desconhecida, provavelmente a sua liberação nas fezes humanas se deve a ingestão de alimentos contaminados ou de parasitas (SIQUEIRA et al., 2018; ROSARIO; DUFFY; BREITBART, 2012; ZHAO; ROSARIO; BREITBART, 2019).

A análise de 300 amostras de fezes humana resultou na identificação de nove genomas do vírus CRESS, um relacionado a smacovírus e de outros oito genomas

relatados nas fezes de diferentes mamíferos, não é descartada a possibilidade de células entéricas serem hospedeiras (ALTAN et al., 2017; VARSANI; KRUPOVIC, 2018).

4.4.6 Bacteriófagos

Os bacteriófagos compõem a maior parte do viroma do intestino humano, influenciando na digestão dos alimentos, regulando a diversidade microbiana no trato gastrointestinal humano através da replicação lítica e lisogênica, desenvolve importante papel no controle de patógenos (ZHANG et al., 2005). A maioria dos vírus de DNA em amostras fecais adultas são bacteriófagos.

Todas as amostras fecais apresentaram membros de alguma família de bacteriófagos, entre estas famílias, foram detectadas as classificadas como vírus de DNA de fita dupla em eles: *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Herelleviridae* e *Myoviridae*, e os vírus de DNA de fita simples das famílias *Microviridae* e *Inoviridae*.

As sequências identificadas por bacteriófagos estão diretamente ligadas a ocorrência de enterobactérias, agentes patológicos causadores da diarreia em humanos, ou seja, a diversidade de bacteriófagos no intestino humano está relacionada a diversidade de seus hospedeiros celulares, a evolução e ao processo de transferência horizontal de genes (ABELES; PRIDE, 2014).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os avanços das tecnologias de sequenciamento genômico possibilitou a identificação e a caracterização da diversidade de vírus, propondo uma nova abordagem na classificação taxonômica considerando as relações filogenéticas. O presente estudo buscou na utilização das técnicas em metagenômica viral identificar vírus entericos em amostras fecais de pacientes com comorbidade em diarreia aguda, residentes em comunidades ribeirinhas do Município de Santana.

O sequenciamento genômico dos vírus presentes em 50 amostras fecais dos pacientes com diarreia, elucida a diversidade viral que integra o viroma humano, e dispõem para a vigilância dos vírus emergentes, ressaltando a sua importância para a compressão futura do seu papel na incidência de infecções gastrointestinais.

As sequências virais obtidas, foram confrontadas com sequências que integram o banco de dados genômicos, gerando um total de 227.502 leituras de sequências de alta qualidade de alinhamento com as sequências no BLAST. Foram detectadas sequências de 20 famílias de vírus, a maioria de bacteriófagos.

Em amostras fecais de três crianças de diferentes localidades foram detectadas as famílias *Picornaviridae*, *Astroviridae* e *Caliciviridae*, que possuem espécies diretamente relacionadas com a ocorrência de diarreia aguda corroborando para a maior incidência de vírus entéricos nos primeiros anos de vida, indicando que agentes virais são causadores da diarreia aguda, e dificilmente são identificados.

Outras espécies foram detectadas que integram as famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Polyomaviridae*, *Circoviridae*, *Anelloviridae*, *Tombusviridae* e *Phycodnaviridae*, as suas ocorrências em amostras fecais ainda é inexplicável, não sendo possível atribuir a sua capacidade de replicação no intestino humano ou a sua patogenecidade.

As condições socioeconômicas, demográficas, ambientais e culturais nas comunidades ribeirinhas é propícia para disseminação de agentes infecciosos. a identificação de vírus perpassa pelas condições insalubres, como a ausência de água potável e saneamento básico que vivem os ribeirinhos, apresentando constantes episódios de diarreia aguda. Enfim, a metagenômica viral é uma ferramenta primordial para a compreensão da epidemiologia molecular e na vigilância de vírus emergentes.

- ABELES, S. R.; PRIDE, D. T. Molecular bases and role of viruses in the human microbiome. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 23, p. 3892–3906, 2014. doi: 10.1016/j.jmb.2014.07.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283614003301?via%3Dihub>. Acesso em 25 de julho de 2021.
- ABERGEL, C.; LEGENDRE, M.; CLAVERIE, J.-M. The rapidly expanding universe of giant viruses: Mimivirus, Pandoravirus, Pithovirus and Mollivirus. **FEMS microbiology reviews**, v. 39, n. 6, p. 779–796, 2015. doi: 10.1093/femsre/fuv037. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/39/6/779/550971>. Acesso em 25 de Julho de 2021.
- ALTAN, E.; DEL VALLE, M. J.; DENG, X.; PHAN, T. G.; SADEGHI, M.; DELWART, E.L. Small Circular Rep-Encoding Single- Stranded DNA Genomes in Peruvian Diarrhea Virome. **Genome Announc.** v. 5, n. 38, p. e00822-17, 2017. Doi: 10.1128/genomeA.00822-17. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28935725/>. Acesso em 12 de agosto de 2020.
- ARNOLD, M. M. The Rotavirus Interferon Antagonist NSP1: Many Targets, Many Questions. **Journal of Virology**, v. 90, n. 11, p. 5212–5215, 2016. doi: 10.1128/JVI.03068-15. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.03068-15>. Acesso em 25 de Julho de 2021.
- AYYILDIZ, D.; PIAZZA, S. Introduction to Bioinformatics. **Methods in Molecular Biology**, v. 1986, p. 1–15, 2019. doi: 10.1007/978-1-4939-9442-7_1. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-9442-7_1. Acesso em 25 de Julho de 2021.
- BERGQVIST, C.; KURBAN, M.; ABBAS, O. Orf virus infection. **Reviews in Medical Virology**, v. 27, n. 4, p. e1932, 2017. doi: 10.1002/rmv.1932. Disponível: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.1932>. Acesso em 25 de Julho de 2021.
- BIBBY, K. Metagenomic identification of viral pathogens. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 275–279, 2013. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.01.016. Disponível: [https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799\(13\)00029-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779913000292%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(13)00029-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779913000292%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em 25 de Julho de 2021.
- BOSCH, A.; PINTÓ, R. M.; GUIX, S. Human Astroviruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 1048–1074, 2014. doi: 10.1128/CMR.00013-14. Disponível: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00013-14>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

BRANDT, K. G.; ANTUNES, M. M.; SILVA, G. A. P. Acute diarrhea: evidence-based management. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 6, Supplement 1, p. S36–S43, 2015. doi: 10.1016/j.jped.2015.06.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021755715001205?via%3Dihub>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. Acesso em 25 de Julho de 2021.

BREITBART, M.; DELWART, E.; ROSARIO, K.; SEGALÉS, J. VARSANI, A. ICTV Virus Taxonomy Profile: Circoviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 8, p. 1997–1998, 2017. doi: 10.1099/jgv.0.000871. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000871>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

BÜHLER, H. F.; IGNOTTI, E.; NEVES, S. M. A.S.; HACON SS. Spatial analysis of integrated determinant indicators of mortality from acute diarrhea in children under 1 year of age in geographical regions. **Ciencia & Saude Coletiva**, v. 19, n. 10, p. 4131–4140, 2014. <https://doi.org/10.1590/1413-812320141910.09282014>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232014001004131. Acesso em 12 de agosto de 2020.

CASTRIGNANO, S. B.; NAGASSE-SUGAHARA, T. K. The metagenomic approach and causality in virology. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, 2015. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/rsp/v49/pt_0034-8910-rsp-0034-89102015049005475.pdf. Acesso em 12 de agosto de 2020.

CHEN, C.; KHALEEL, S.S.; HUANG, H.; WU, C. H. Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. **Source Code for Biology and Medicine**, v. 9, p. 8, 2014. doi: 10.1186/1751-0473-9-8. Disponível em: <https://scfbm.biomedcentral.com/articles/10.1186/1751-0473-9-8>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

CILLI, A.; LUCHS, A.; LEAL, E.; GILL, D.; MILAGRES, F. A. P.; KOMNINAKIS, S.V.; BRUSTULIN, R.; TELES, M.D.A.R.; LOBATO, M. C.A.B.S.; CHAGAS, R. T. D.; ABRÃO, M. F. N. D. S.; SOARES, C. V. D. A.; DENG, X.; DELWART, E.; SABINO, E. C.; COSTA, A. C. D. Human sapovirus GI.2 and GI.3 from children with acute gastroenteritis in northern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 114, p. e180574, 4 abr. 2019. doi: 10.1590/0074-02760180574. PMID: 30970051; PMCID: PMC6452520. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762019000100403. Acesso em 12 de agosto de 2020.

COLSON, P.; FANCELLO, L.; GIMENEZ, G.; ARMOUGOM, F.; DESNUES, C.; FOURNOUS, G.; YOOSUF, N.; MILLION, M. L. A.; SCOLA, B.; RAOULT, D. Evidence of the megavirome in humans. **J Clin Virol**, v. 57, n. 3, p. 191–200, 2013. doi: 10.1016/j.jcv.2013.03.018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386653213001248?via%3Dihub>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

DAI, X.Q.; HUA, X.G.; SHAN, T.L.; DELWART, E.; ZHAO, W. Human cosavirus infections in children in China. **J Clin Virol**, v. 48, n. 3, p. 228–229, 2010. doi:

10.1016/j.jcv.2010.03.024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20537583/>. Acesso em 12 de agosto de 2020.

DÁVILA-RAMOS, S.; CASTELÁN-SÁNCHEZ, H. G.; MARTÍNEZ-ÁVILA, L.; SÁNCHEZ-CARBENTE, M. D. R.; PERALTA, R.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; DOBSON, A. D. W.; GONZALEZ, R. A.; PASTOR, N.; BATISTA-GARCÍA, R. A. A Review on Viral Metagenomics in Extreme Environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2403, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.02403. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6842933/> Acesso em 12 de agosto de 2020.

DELWART, E. A roadmap to the human virome. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 2, p. e1003146, fev. 2013. Doi: 10.1371/journal.ppat.1003146. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3573120/> Acesso em 12 de agosto de 2020.

DELWART, E. L. Viral metagenomics. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, n. 2, p. 115–131, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rmv.532>. Acesso em 12 de agosto de 2020.

DESSELBERGER, U. Viral gastroenteritis. **Medicine (Abingdon, England: UK ed.)**, v. 45, n. 11, p. 690–694, 2017. doi: 10.1024/1661-8157/a003182. Disponível em: <https://econtent.hogrefe.com/doi/10.1024/1661-8157/a003182>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

DESSELBERGER, U. Caliciviridae Other Than Noroviruses. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 286, 2019. doi: 10.3390/v11030286. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/3/286>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

DIEZ-VALCARCE, M.; CASTRO, C. J.; MARINE, R.L.; HALASA, N.; MAYTA, H.; SAITO, M.; TSAKNARIDIS, L.; PAN, C.Y.; BUCARDO, F.; BECKER-DREPS, S.; LOPEZ, M. R.; MAGAÑA, L. C.; NG, T. F. F.; VINJÉ, J. Genetic diversity of human sapovirus across the Americas. **J Clin Virol**, v. 104, p. 65–72, 2018. doi: 10.1016/j.jcv.2018.05.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386653218301264?via%3Dihub>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

DOMINGOS, I. M.; GONÇALVES, R. M. População ribeirinha no Amazonas e a desigualdade no acesso à saúde. **Revista de Estudos Constitucionais, Hermenêutica e Teoria do Direito**, v. 11, n. 1, p. 99–108, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4013/rechtd.2019.111.06>. Disponível em: <http://www.revistas.unisinos.br/index.php/RECHTD/article/view/rechtd.2019.111.06>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

DORNAS, F. P.; ASSIS, F. L.; AHERFI, S.; ARANTES, T.; ABRAHÃO, J. S.; COLSON, P.; LA SCOLA, B. A Brazilian Marseillevirus Is the Founding Member of a Lineage in Family Marseilleviridae. **Viruses**, v. 8, n. 3, p. 76, 2016. doi: 10.3390/v8030076. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/8/3/76>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

DUNIGAN, D. D.; FITZGERALD, L. A.; VAN ETEN, J. L. Phycodnaviruses: a peek at genetic diversity. **Virus Research**, v. 117, n. 1, p. 119–132, 2006. doi: 10.1016/j.virusres.2006.01.024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170206000438?via%3Dihub>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

EASTERBROOK, P. J.; ROBERTS, T.; SANDS, A.; PEELING R. Diagnosis of viral hepatitis. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 12, n. 3, p. 302–314, 2017. Disponível em: https://journals.lww.com/co-hivandaids/Fulltext/2017/05000/Diagnosis_of_viral_hepatitis.17.aspx. Acesso em 25 de Julho de 2021.

ELLWANGER, J. H.; VEIGA, A. B. G.; KAMINSKI, V. L.; VALVERDE-VILLEGAS, J. M.; FREITAS, A. W. Q.; CHIES, J. A. B. Control and prevention of infectious diseases from a One Health perspective. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/gmb/a/RX9fmmwVXm5MD5h5TMsNyhk/?lang=en>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

ESTADO DO AMAPÁ. **PLANO ESTADUAL DE SAÚDE 2020-2023**, 2020. Disponível em: [https://saude.portal.ap.gov.br/arquivos/PES%20-%20PLANO%20ESTADUAL%20DE%20SA%C3%A9DE%202020%20A%202023%20\(1\).pdf](https://saude.portal.ap.gov.br/arquivos/PES%20-%20PLANO%20ESTADUAL%20DE%20SA%C3%A9DE%202020%20A%202023%20(1).pdf). Acesso em 25 de Julho de 2021.

FANCELLO, L.; RAOULT, D.; DESNUES, C. Computational tools for viral metagenomics and their application in clinical research. **Virology**, v. 434, n. 2, p. 162–174, 20 dez. 2012. doi: 10.1016/j.virol.2012.09.025. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682212004667?via%3Dihub>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

FERREIRA, J. A.; SANTOS, M. C.; SOUSA JÚNIOR, E. C.; ALVES, J. C. S.; TAVARES, F. N.; GOMES, M. L. C.; LINHARES, A. C.; WANZELLER, A. L. M. Detecção e caracterização de adenovírus humano proveniente de casos de paralisia flácida aguda, na Região Norte do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 47–54, 2014. doi: 10.5123/S2176-62232014000300006. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v5n3/v5n3a06.pdf>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

FINKBEINER, S. R.; ALLRED, A. F.; TARR, P. I.; KLEIN, E. J.; KIRKWOOD, C. D.; WANG, D. Metagenomic Analysis of Human Diarrhea: Viral Detection and Discovery. **PLOS Pathogens**, v. 4, n. 2, p. e1000011, 29 fev. 2008. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000011> Acesso em 12 de agosto de 2020.

FINKBEINER, S. R.; LI, Y.; RUONE, S.; CONRARDY, C.; GREGORICUS, N.; TONEY, D.; VIRGIN, H. W.; ANDERSON, L. J.; VINJÉ, J.; WANG, D.; TONG, S. Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. **Journal of Virology**, v. 83, n. 20, p. 10836–10839, 2009a. doi: 10.1128/JVI.00998-09. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00998-09>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

FINKBEINER, S. R.; HOLTZ, L. R.; JIANG, Y.; RAJENDRAN, P.; FRANZ, C. J.; ZHAO, G.; KANG, G.; WANG, D. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. **Virology Journal**, v. 6, p. 161, 2009b. doi: 10.1186/1743-422X-6-161. Disponível em: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-6-161>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

FINKBEINER, S. R.; KIRKWOOD, C. D.; WANG, D. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. **Virology Journal**, v. 5, n. 1, p. 117, 2008. doi: 10.1186/1743-422X-5-117. Disponível em:

<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-5-117>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

GAMA, A. S. M.; FERNANDES, T. G.; PARENTE, R. C. P.; SILVA, R. C. P. P.; SECOLI, R. S. Inquérito de saúde em comunidades ribeirinhas do Amazonas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 2, 2018. doi.org/10.1590/0102-311X00002817. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/nWyTKM4WRV5Gxr4pSVT4Mnp/abstract/?lang=pt>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

GOMES, R. K. S.; SILVA, M. DO C. L. DA; MEDEIROS, M. M. A sustentabilidade da educação socioambiental no assentamento do Anauerapucu, Amazônia Amapaense. **REMEA - Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, v. 32, n. 1, p. 329–343, 2015. doi.org/10.14295/remea.v32i1.5093. Disponível em: <https://periodicos.furg.br/remea/article/view/5093>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

GONZÁLEZ, G. G.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J. E. Molecular epidemiology of enteric viruses in children with sporadic gastroenteritis in Valencia, Venezuela. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 11, p. 1972–1982, 2011. Doi: 10.1002/jmv.22185. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21915873/> Acesso em 12 de agosto de 2020.

GONZALEZ-OCHOA, G.; FLORES-MENDOZA, L. K.; ICEDO-GARCIA, R.; GOMEZ-FLORES, R.; TAMEZ-GUERRA, P. Modulation of rotavirus severe gastroenteritis by the combination of probiotics and prebiotics. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 7, p. 953–961, 2017. doi: 10.1007/s00203-017-1400-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00203-017-1400-3>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

GRENINGER, A. L. A decade of RNA virus metagenomics is (not) enough. **Virus Research**, v. 244, p. 218–229, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29055712/>. Acesso em 12 de agosto de 2020.

GUIMARÃES, A. F.; BARBOSA, V. L. M.; SILVA, M. P.; PORTUGAL, J. K. A.; REIS, M. H. S.; GAMA, A. S. M. Acesso a serviços de saúde por ribeirinhos de um município no interior do estado do Amazonas, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, 2020. doi.org/10.5123/s2176-6223202000178. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232020000100012&lng=pt&nrm=iso. Acesso em 25 de Julho de 2021.

GUTIERREZ, D. M. D.; MINAYO, M. C. DE S. Papel da mulher de camadas populares de Manaus na produção de cuidados da saúde. **Saúde e Sociedade**, v. 18, p. 707–720, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0104-12902009000400014>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sausoc/a/LCLqdxsj8KpR4m5vLzXmtXL/abstract/?lang=pt>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

HALARY, S.; TEMMAM, S.; RAOULT, D.; DESNUES, C. Viral metagenomics: are we missing the giants? **Current Opinion in Microbiology**, v. 31, p. 34–43, 2016. doi: 10.1016/j.mib.2016.01.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527416000072?via%3Dihub>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669–685,

2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15590779/>. Acesso em 12 de agosto de 2020.

HOLTZ, L. R. FINKBEINER, S.R; KIRKWOOD, C.D; WANG. D. Identification of a novel picornavirus related to cosaviruses in a child with acute diarrhea. **Virology Journal**, v. 5, p. 159, 22 dez. 2008. Disponível em: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-5-159>. Acesso em 12 de agosto de 2020.

IBGE. 2018. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ap/panorama>> Acesso: em 25 de Julho de 2021.

IBGE. **Município de Santana**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ap/santana>>. Acesso em: 19 abril 2021.

ILLUMINA. **MiSeq System**, 2021. Disponível em: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/miseq-system-data-sheet-m-gl-00006/miseq-data-sheet-m-gl-00006.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2021.

IMADA, K. S.; ARAÚJO, T. S.; MUNIZ, P.T.; PÁDUA, V.L. Socioeconomic, hygienic, and sanitation factors in reducing diarrhea in the Amazon. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, 2016. doi: 10.1590/S1518-8787.2016050006505. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/3yMjqpKxjhcVFZpk7Ht5s5L/?lang=en>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

JEONG, H. S.; JEONG, A.; CHEON, D.-S. Epidemiology of astrovirus infection in children. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 55, n. 3, p. 77–82, 2012. doi: 10.3345/kjp.2012.55.3.77. Disponível em: <https://www.e-cep.org/journal/view.php?doi=10.3345/kjp.2012.55.3.77>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

JIANG, H.; HOLTZ, L. R.; BAUER, I.; FRANZ, C. J.; ZHAO, G.; BODHIDATTA, L.; SHRESTHA, S. K.; KANG, G.; WANG, D. Comparison of novel MLB-clade, VA-clade and classic human astroviruses highlights constrained evolution of the classic human astrovirus nonstructural genes. **Virology**, v. 436, n. 1, p. 8–14, 2013. doi: 10.1016/j.virol.2012.09.040. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682212004928?via%3Dihub>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

JOHNSON, C.; HARGEST, V.; CORTEZ, V.; MELIOPOULOS, V.A.; SCHULTZ-CHERRY, S. Astrovirus Pathogenesis. **Viruses**, v. 9, n. 1, p. 22, 2017. doi: 10.3390/v9010022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/9/1/22>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

JUSTINO, M. C. A.; CAMPOS, E. A.; MASCARENHAS, J. D. P.; SOARES, L. S.; GUERRA, S. F. S.; FURLANETO, I. P.; PAVÃO, M. J. C.; MACIEL, T. S.; FARIAS, F. P.; BEZERRA, O. M.; VINENTE, C. B. G.; BARROS, R. J. S.; LINHARES AC. Rotavirus antigenemia as a common event among children hospitalised for severe, acute gastroenteritis in Belém, northern Brazil. **BMC pediatrics**, v. 19, n. 1, p. 193, 2019. doi: 10.1186/s12887-019-1535-2. Disponível em: <https://bmcpediatr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12887-019-1535-2>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

KANAI, Y.; KAWAGISHI, T.; NOUDA, R.; ONISHI, M.; PANNACHA, P.; NURDIN, J. A.; NOMURA, K.; MATSUURA, Y.; KOBAYASHI, T. Development of Stable Rotavirus Reporter Expression Systems. **Journal of Virology**, v. 93, n. 4, 2019. doi: 10.1128/JVI.01774-18. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.01774-18>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

KAPOOR, A.; LI, L.; VICTORIA, J.; ODERINDE, B.; MASON, C.; PANDEY, P.; ZAIDI, S. Z.; DELWART, E. Multiple novel astrovirus species in human stool. **The Journal of General Virology**, v. 90, n. Pt 12, p. 2965–2972, 2009. doi: 10.1099/vir.0.014449-0. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.014449-0>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

KUHN, J. H.; SIBLEY, S.D.; CHAPMAN, C. A.; KNOWLES, N. J.; LAUCK, M.; JOHNSON, J. C.; LAWSON, C. C.; LACKEMEYER, M. G.; VALENTA, K.; OMEJA, P.; JAHRLING, P. B.; O'CONNOR, D. H.; GOLDBERG, T. L. Discovery of Lanama Virus, a Distinct Member of Species Kunsagivirus C (Picornavirales: Picornaviridae), in Wild Vervet Monkeys (*Chlorocebus pygerythrus*). **Viruses**, v. 12, n. 12, p. 1436, 2020. doi: 10.3390/v12121436. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/12/1436>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

KUMTHIP, K.; KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N. Molecular epidemiology and genotype distributions of noroviruses and sapoviruses in Thailand 2000-2016: A review. **Journal of Medical Virology**, v. 90, n. 4, p. 617–624, abr. 2018. doi: 10.1002/jmv.25019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.25019>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

LAMOUNIER, T. A.; OLIVEIRA, L. M.; CAMARGO, B. R.; RODRIGUES, K. B.; NORONHA, E. F.; RIBEIRO, B. M.; NAGATA, T. Production of Brazilian human norovirus VLPs and comparison of purification methods. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 46, n. 4, p. 1265–1268, dez. 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/WKzkN6SzjfxBxd3GxjcC9Fs/?lang=en>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

LEDERGERBER, C.; DESSIMOZ, C. Base-calling for next-generation sequencing platforms. **Briefings in Bioinformatics**, v. 12, n. 5, p. 489–497, set. 2011. doi: 10.1093/bib/bbq077. Disponível em: <https://academic.oup.com/bib/article/12/5/489/268399>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

LESTARI, F. B.; VONGPUNSAWAD, S.; WANLAPAKORN, N.; POOVORAWAN, Y. Rotavirus infection in children in Southeast Asia 2008-2018: disease burden, genotype distribution, seasonality, and vaccination. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 66, 2020. doi: 10.1186/s12929-020-00649-8. Disponível em: <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-020-00649-8>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

LEWIS-ROGERS, N.; CRANDALL, K. A. Evolution of Picornaviridae: an examination of phylogenetic relationships and cophylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 3, p. 995–1005, 2010. doi: 10.1016/j.ympev.2009.10.015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1055790309004096?via%3Dihub>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

LI, L.; KAPOOR, A.; SLIKAS, B.; BAMIDELE, O. S.; WANG, C.; SHAUKAT, S.; MASROOR, M. A.; WILSON, M. L.; NDJANGO, J. B.; PEETERS, M.; GROSS-CAMP, N. D.; MULLER, M. N.; HAHN, B. H.; WOLFE, N. D.; TRIKI, H.; BARTKUS, J.; ZAIDI, S. Z.; DELWART, E. Multiple Diverse Circoviruses Infect Farm Animals and Are Commonly Found in Human and Chimpanzee Feces. **Journal of Virology**, v. 84, n. 4, p. 1674–1682, 2010. doi: 10.1128 / JVI.02109-09. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02109-09>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

LI, L.; DELWART, E. From orphan virus to pathogen: the path to the clinical lab. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 4, p. 282–288, 2011. doi: 10.1016/j.coviro.2011.07.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22003378/>. Acesso em 12 de agosto de 2020.

LIU, H.; GUO, M.; JIANG, Y.; CAO, Y.; QIAN, Q.; HE, X.; HUANG, K.; ZHANG, J.; XU, W. Diagnosing and tracing the pathogens of infantile infectious diarrhea by amplicon sequencing. **Gut Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 12, 2019. Disponível em: <https://gutpathogens.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13099-019-0292-y>. Acesso em 12 de agosto de 2020.

LUCHS, A.; LEAL, E.; KOMNINAKIS, S. V.; MILAGRES, F. A. P.; BRUSTULIN, R.; TELES, M. A. R.; GILL, D. E.; DENG, X.; DELWART, E.; SABINO, E. C.; COSTA, A. C. Wuhan large pig roundworm virus identified in human feces in Brazil. **Vírus Genes**, v.54, n. 3, p. 470 – 473, 2018. Doi: 10.1007/s11262-018-1557-0 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29594920/> Acesso em 12 de agosto de 2020.

LUCHS, A.; TIMENETSKY, M. DO C. S. T. Group A rotavirus gastroenteritis: post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 14, n. 2, p. 278–287, 2016. doi: 10.1590/S1679-45082016RB3582. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eins/a/6jR7c5hmqmT3K8zBybbgc7K/?lang=en>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

MACEDO, E. R. FERNANDES, M. R.; AMORIM, M.; LIMA, T.; CARVALHO, L. R. Perfil epidemiológico de Doenças Diarreicas Agudas notificadas no hospital municipal de Una-Ba no período de 2013 a 2014. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 7, n. 2, p. 25–30, 2018. Disponível em: <http://revistaadmmade.estacio.br/index.php/saudesantacatarina/article/viewFile/4541/47964933>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

MACHADO, E. S. S.; CUNHA, J. V.; ROSSONI, L. C. R.; FILOCREÃO, A. S. M. A ineficiência do saneamento básico e suas implicações na saúde pública no distrito do Elesbão – Santana/AP. **PRACS: Revista Eletrônica de Humanidades do Curso de Ciências Sociais da UNIFAP**, v. 3, n. 3, p. 239–240, 2010a. Disponível em: <https://periodicos.unifap.br/index.php/pracs/article/view/177/n3Emanuel.pdf>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

MACHADO, F. S. N.; CARVALHO, M. A. P.; MATARESI, A.; MENDONÇA, E. T.; CARDOSO, L. M.; YOGIHA, M. S.; RIGATO, M. M.; SALAZAR, M. Utilização da telemedicina como estratégia de promoção de saúde em comunidades ribeirinhas da Amazônia: experiência de trabalho interdisciplinar, integrando as diretrizes do SUS. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 247–254, jan. 2010b. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232010000100030>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/csc/a/Qg6VG4M7chHndDJy7KYB6yr/abstract/?lang=pt>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

MANUEL, C. S.; MOORE, M. D.; JAYKUS, L.-A. Predicting human norovirus infectivity - Recent advances and continued challenges. **Food Microbiology**, v. 76, p. 337–345, dez. 2018. doi: 10.1016/j.fm.2018.06.015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002018301370?via%3Dihub>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

MARA, D.; LANE, J.; SCOTT, B.; TROUBA, D. Sanitation and Health. **PLOS Medicine**, v. 7, n. 11, p. e1000363, 16 nov. 2010. doi:10.1371/journal.pmed.1000363. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1000363>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

OLIVEIRA, D. M. M.; SOUZA, M.; FIACCADORI, F. S.; SANTOS, H. C. P.; CARDOSO, D. D. P. 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. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 9, p. 1569–1575, set. 2014. doi: 10.1002/jmv.23791. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.23791>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

MARTÍNEZ AZCONA, O.; GÓMEZ, L. V.; SÁNCHEZ, P. B.; SOTO, R. D.; SUÁREZ, L. M. M. Gastroenteritis agudas y virus entéricos: impacto de la detección de norovirus. **Anales de Pediatría**, v. 87, n. 3, p. 143–147, 1 set. 2017. DOI: 10.1016 / j.anpedi.2016.08.006. Disponível em: <https://www.analesdepediatria.org/es-gastroenteritis-agudas-virus-entericos-impacto-articulo-S1695403316302533>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

MENDES, A. E. A.; MENDES, H. T. A.; ANJOS, D. N.; LOPES, V. S. V. B. Qualidade das águas do Rio Vieira após implantação da estação de tratamento de efluentes. **Revista Agrogeoambiental**, v. 8, n. 2, 14 jul. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v8n22016791>. Disponível em: <https://agrogeoambiental.ifsuldeminas.edu.br/index.php/Agrogeoambiental/article/view/791#:~:text=Os%20resultados%20demonstraram%20que%20com,86%25%20at%C3%A9%20outubro%20de%202012>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

MENEGUESSI, G. M.; MOSSRI, R. M.; SEGATTO, T. C. V.; REIS, P. O. Morbimortalidade por doenças diarreicas agudas em crianças menores de 10 anos no Distrito Federal, Brasil, 2003 a 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 4, p. 721–730, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/ress/v24n4/2237-9622-ress-24-04-00721.pdf>. Acesso em 12 de agosto de 2020.

MITSUHASHI, W.; MIYAMOTO, K.; WADA, S. The complete genome sequence of the Alphaentomopoxvirus *Anomala cuprea* entomopoxvirus, including its terminal hairpin loop sequences, suggests a potentially unique mode of apoptosis inhibition and mode of DNA replication. **Virology**, v. 452–453, p. 95–116, 1 mar. 2014. doi:10.1016/j.virol.2013.12.036. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682213007083?via%3Dihub>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

NG, T. F.; MAGAÑA, L.; MONTMAYEUR, A.; LOPEZ, M. R.; GREGORICUS, N.; OBERSTE, M. S.; VINJÉ, J.; NIX, W. A. Characterization of a Salivirus (Picornaviridae) from a Diarrheal Child in Guatemala. **Genome Announcements**, v. 4, n. 1, p. e01751-15,

18 fev. 2016. doi: 10.1128/genomeA.01751-15. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/genomeA.01751-15>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

NIX, W. A.; KHETSURIANI, N.; PEÑARANDA, S.; MAHER, K.; VENCZEL, L.; CSELKÓ, Z.; FREIRE, M. C.; CISTERNA, D.; LEMA, C. L.; ROSALES, P.; RODRIGUEZ, J. R.; RODRIGUEZ, W.; HALKYER, P.; RONVEAUX, O.; PALLANSCH, M. A.; OBERSTE, M. S. Diversity of picornaviruses in rural Bolivia. **The Journal of General Virology**, v. 94, n. Pt 9, p. 2017–2028, set. 2013. doi: 10.1099 / vir.0.053827-0. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.053827-0>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

OKA, T.; WANG, Q.; KATAYAMA, K.; SAIF, L. J. Comprehensive Review of Human Sapoviruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 32, jan. 2015. doi: 10.1128/CMR.00011-14. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00011-14>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

OLIVARES, A. I. O.; MORAES, M. T. B.; QUEIROZ, H. C. F.; PIMENTA, Y.; LEITE, J. P. G. First report of human astrovirus MLB2 in Brazil detected in feces of children with acute gastroenteritis living in the state of Roraima, Northern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 575–579, 1 nov. 2020. doi: 10.1016/j.bjid.2020.10.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867020301483?via%3Dihub>. Acesso em 25 de Julho de 2021.

OLORTEGUI, M. P.; ROUHANI, S.; YORI, P. P.; SALAS, M. S.; TRIGOSO, D. R.; MONDAL, D.; BODHIDATTA, L.; PLATTS-MILLS, J.; SAMIE, A.; KABIR, F.; LIMA, A.; BABJI, S.; SHRESTHA, S. K.; MASON, C. J.; KALAM, A.; BESSONG, P.; AHMED, T.; MDUMA, E.; BHUTTA, Z. A.; LIMA, I.; RAMDASS, R.; MOULTON, L. H.; LANG, D.; GEORGE, A.; ZAIDI, A. K. M.; KANG, G.; HOUP, E. R.; KOSEK, M. N. Astrovirus Infection and Diarrhea in 8 Countries. **Pediatrics**, v. 141, n. 1, jan. 2018. doi: 10.1542/peds.2017-1326. Disponível em: <https://pediatrics.aappublications.org/content/141/1/e20171326>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

ONU. **Levels & Trends in Child Mortality. Report 2015 Estimates Developed by the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation United, 2015.**, 2015. Disponível em: <https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/mortality/child-mortality-report-2015.asp>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

PAIVA, R. F. P. S.; SOUZA, M. F. P. Associação entre condições socioeconômicas, sanitárias e de atenção básica e a morbidade hospitalar por doenças de veiculação hídrica no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, 2018. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00017316>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/c3DgtD4MPBmxLdpmW8NxBHk/abstract/?lang=pt>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

PEI, N.; ZHANG, J.; MA, J.; LI, L.; LI, M.; LI, J.; SUN, Y.; JI, J.; JIANG, H.; HOU, Y.; XU, F.; LU, H.; ZHANG, R.; WEI, X.; XU, X.; DENG, J. First report of human salivirus/klassevirus in respiratory specimens of a child with fatal adenovirus infection. **Virus Genes**, v. 52, n. 5, p. 620–624, out. 2016. doi: 10.1007/s11262-016-1361-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11262-016-1361-7>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

PENG, X.; WANG, J.; ZHANG, Z.; XIAO, Q.; LI, M.; PAN, Y. Re-alignment of the unmapped reads with base quality score. **BMC bioinformatics**, v. 16 Suppl 5, p. S8, 2015. doi: 10.1186/1471-2105-16-S5-S8. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-16-S5-S8>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

PEREIRA, J. R.; STRINTA, L.; BOTELHO, G. C. S.; ORMONDE JUNIOR, J. C.; BARROS, L. C. Diarreia em crianças menores de cinco anos em uma unidade de saúde da família. **Revista de Enfermagem da UFSM**, v. 4, n. 3, p. 594–601, 19 nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.5902/2179769213490>. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/reufsm/article/view/13490>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

PÉROT, P.; LECUIT, M.; ELOIT, M. Astrovirus Diagnostics. **Viruses**, v. 9, n. 1, p. 10, jan. 2017. doi: 10.3390/v9010010. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/9/1/10>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

PHAN, T. G.; PHUNG, V. O. N.; SDIRI-LOULIZI, K.; AOUNI, M.; POTHIER, P.; AMBERT-BALAY, K.; DENG, X.; DELWART, E. Divergent gyroviruses in the feces of Tunisian children. **Virology**, v. 446, n. 1–2, p. 346–348, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.08.020>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682213004935>. Acesso em 12 de agosto de 2020.

PHAN, T. G.; LI, L.; O'RYAN, M. G.; CORTES, H.; MAMANI, N.; BONKOUNGOU, I. J. O.; WANG, C.; LEUTENEGGER, C. M.; DELWART, E. A third gyrovirus species in human faeces **The Journal of General Virology**, v. 93, n. Pt 6, p. 1356–1361, 2012. doi: 10.1099/vir.0.041731-0. Epub 2012 Mar 14. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3755516/> Acesso em 12 de agosto de 2020.

PHAN, T. G.; VO, N. P.; BONKOUNGOU, I. J.; KAPOOR, A.; BARRO, N.; O'RYAN, M.; KAPUSINSZKY, B.; WANG, C.; DELWART, E. Acute Diarrhea in West African Children: Diverse Enteric Viruses and a Novel Parvovirus Genus. **Journal of Virology**, v. 86, n. 20, p. 11024–11030, 2012. Doi: 10.1128/JVI.01427-12 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3457132/>. Acesso em 12 de agosto de 2020.

PHAN, T. G.; MORI, D.; DENG, X.; RAJINDRAJITH, S.; RANAWAKA, U.; NG, F. T. F.; BUCARDO-RIVERA, F.; ORLANDI, P.; AHMED, K.; DELWART, E. Small circular single stranded DNA viral genomes in unexplained cases of human encephalitis, diarrhea, and in untreated sewage. **Virology**, v. 482, p. 98–104, ago. 2015. doi: 10.1016/j.virol.2015.03.011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682215001476?via%3Dihub>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

PINTO, M.; DOBSON, S. BK and JC virus: a review. **The Journal of Infection**, v. 68 Suppl 1, p. S2-8, jan. 2014. doi: 10.1016/j.jinf.2013.09.009. Disponível em: [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(13\)00276-4/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(13)00276-4/fulltext). Acesso em 26 de Julho de 2021.

PIRES, R.; BATOUXAS, C.; LOZA, T.; PRUDÊNCIA VAZ, P. Uma causa pouco habitual de diarreia. **Galicia Clínica**, v. 76, n. 1, p. 25, 2015. Disponível em: <https://galiciaclinica.info/PDF/31/636.pdf#:~:text=Nos%20pa%C3%ADses%20subdesenvo>

lvidos%2C%20%20C3%A9%20fre,s%20C3%A3o%20as%20causas%20mais%20comuns.
Acesso em 26 de Julho de 2021.

POULAIN, C.; GALENO, H.; LOAYZA, S.; VERGARA, N.; VALDIVIESO, F.; CORIA, P.; SOTOMAYOR, V.; SIMIAN, M.E.; ACEVEDO, J.; FARFÁN, M.J. Molecular detection of gastrointestinal pathogens among children under 5 years old with diarrhea in a hospital center for rotavirus sentinel surveillance in Chile. **Revista chilena de infectología**, v. 38, n. 1, p. 54–60, fev. 2021. doi: 10.4067/S0716-10182021000100054. Disponível em: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182021000100054&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em 26 de Julho de 2021.

PRADO, T.; MIAGOSTOVICH, M. P. Environmental virology and sanitation in Brazil: a narrative review. **Cadernos De Saude Publica**, v. 30, n. 7, p. 1367–1378, jul. 2014. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00109213>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X2014000701367&script=sci_abstract&tlng=en. Acesso em 12 de agosto de 2020.

QIU, F. Z.; SHEN, X. X.; LI, G. X.; ZHAO, L.; CHEN, C.; DUAN, S. X.; GUO, J. Y.; ZHAO, M. C.; YAN, T. F.; QI, J. J.; WANG, L.; FENG, Z. S.; MA, X. J. Adenovirus associated with acute diarrhea: a case-control study. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 450, 3 set. 2018. doi: 10.1186/s12879-018-3340-1. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3340-1>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

RAHIM, M. A.; UDDIN, K. N. Chikungunya: an emerging viral infection with varied clinical presentations in Bangladesh: Reports of seven cases. **BMC research notes**, v. 10, n. 1, p. 410, 15 ago. 2017. doi: 10.1186/s13104-017-2723-5. Disponível em: <https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-017-2723-5>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

RAJKOMAR, V.; HANNAH, M.; COULSON, I. H.; OWEN, C. M. A case of human to human transmission of orf between mother and child. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 41, n. 1, p. 60–63, jan. 2016. doi: 10.1111/ced.12697. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ced.12697>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

RAMANI, S.; NEILL, F. H.; OPEKUN, A. R.; GILGER, M. A.; GRAHAM, D. Y.; ESTES, M. K.; ATMAR, R. L. Mucosal and Cellular Immune Responses to Norwalk Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 3, p. 397–405, 1 ago. 2015. doi: 10.1093/infdis/jiv053. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/212/3/397/853613>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

REGO, A. P.; LIMA, S. P.; COSTA, M. C. M. D.; SANTOS, L. M. C.; MEDEIROS, W. R.; CAVALCANTE, E. S. Conhecimento das mães de crianças internadas em um hospital universitário acerca da diarreia. **Rev Rene**, v. 15, n. 1, 16 fev. 2014. Disponível em: <http://www.periodicos.ufc.br/rene/article/view/3074>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

REIS, D. C.; ARAÚJO, M. E. C.; SANTOS, S. S. L.; SILVA, S. S. C.; PONTES, F. A. R. Araraiana e Combu: um estudo comparativo de dois contextos ribeirinhos amazônicos. **Temas em Psicologia**, v. 20, n. 2, p. 429–438, dez. 2012. <http://dx.doi.org/10.9788/TP2012.2-11>. Disponível em: http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-389X2012000200011. Acesso em 26 de Julho de 2021.

RIBEIRO, G.O.; LUCHS, A.; MILAGRES, F. A. P.; KOMNINAKIS, S.V.; GILL, L. M. C. A. B. S.; BRUSTULIN, R.; CHAGAS, R. T. D.; ABRÃO, M. F.N. D. S.; SOARES, C. V. D. A.; WITKIN, S. S.; VILLA NOVA, F.; DENG, X.; SABINO, E. C.; DELWART, E.; COSTA, A. C.; LEAL, E. Detecção e caracterização do Enterovírus B73 em uma criança no Brasil. *Vírus*. 28 de dezembro de 2018; 11 (1): 16. doi: 10.3390 / v11010016. PMID: 30597828; PMCID: PMC6357135. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6357135/>. Acesso em 12 de agosto de 2020.

RIOS, L.; CUTOLO, S. A.; GIATTI, L. L.; CASTRO, M.; ROCHA, A. A.; TOLEDO, R. F.; PELICIONI, M. C. F.; BARREIRA, L. P.; SANTOS, J. G. Prevalência de parasitos intestinais e aspectos socioambientais em comunidade indígena no Distrito de Iauaretê, Município de São Gabriel da Cachoeira (AM), Brasil. **Saúde e Sociedade**, v. 16, p. 76–86, ago. 2007. <https://doi.org/10.1590/S0104-12902007000200008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sausoc/a/cb7dQMvJVsGnhpZT6rXRLqS/?lang=pt>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

ROSARIO, K.; BREITBART, M.; HARRACH, B.; SEGALÉS, J.; DELWART, E.; BIAGINI, P.; VARSANI, A. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. **Archives of Virology**, v. 162, n. 5, p. 1447–1463, maio 2017. doi: 10.1007/s00705-017-3247-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-017-3247-y>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

ROSARIO, K.; DUFFY, S.; BREITBART, M. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. **Arch. Virol.** 2012, 157, 1851–1871, doi:10.1007/s00705-012-1391-y.

SÁ, A. D.; FERREIRA, J. F. C. O desenvolvimento da educação básica no Amapá de 1991 a 2003: da retórica à prática. **Educação e Pesquisa**, v. 46, 8 maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-4634202046217318>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ep/a/rb6qPKBWSKqbZPxcfzTHnSC/?lang=pt>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, dez. 1977. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/74/12/5463>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

SANGWAN, N.; LATA, P.; DWIVEDI, V.; SINGH, A.; NIHARIKA, N.; KAUR, J.; ANAND, S.; MALHOTRA, J.; JINDAL, S.; NIGAM, A.; LAL, D.; DUA, A.; SAXENA, A.; GARG, N.; VERMA, M.; KAUR, J.; MUKHERJEE, U.; GILBERT, J. A.; DOWD, S. E.; RAMAN, R.; KHURANA, P.; KHURANA, J. P.; LAL, R. Comparative metagenomic analysis of soil microbial communities across three hexachlorocyclohexane contamination levels. **PloS One**, v. 7, n. 9, p. e46219, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0046219. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0046219>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

SANTOS, N.; MENDES, G. S.; SILVA, R. C.; PENA, G. A.; ROJAS, M.; AMORIM, A. R.; LIMA, D. P. Salivírus e aichivírus A infecções em crianças com gastroenterite no Brasil. **Clin Microbiol Infect.**, v. 21, n. 8, p. 799.e1–3, ago. 2015. doi:10.1016/j.cmi.2015.04.004. Disponível em:

[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(15\)00404-8/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(15)00404-8/fulltext). Acesso em 26 de Julho de 2021.

SATHLER, D.; MONTE-MÓR, R. L.; CARVALHO, J. A. M. As redes para além dos rios: urbanização e desequilíbrios na Amazônia brasileira. **Nova Economia**, v. 19, p. 11–39, 2009. Disponível em: <https://revistas.face.ufmg.br/index.php/novaeconomia/article/view/1036>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

SCHEETS, K.; JORDAN, R.; WHITE, K. A.; HERNÁNDEZ C. Pelarspovirus, a proposed new genus in the family Tombusviridae. **Archives of Virology**, v. 160, n. 9, p. 2385–2393, set. 2015. doi: 10.1007/s00705-015-2500-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-015-2500-5>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

SDIRI-LOULIZI, K.; HASSINE, M.; GHARBI-KHELIFI, H.; SAKLY, N.; CHOUCANE, S.; GUEDICHE, M. N.; POTHIER, P.; AOUNI, M.; AMBERT-BALAY, K. Detection and genomic characterization of Aichi viruses in stool samples from children in Monastir, Tunisia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2275–2278, jul. 2009. doi: 10.1128/JCM.00913-09. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.00913-09>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

SHAN, T.; WANG, C.; CUI, L.; YU, Y.; DELWART, E.; ZHAO, W.; ZHU, C.; LAN, D.; DAI, X.; HUA X. Picornavirus salivirus/klassevirus in children with diarrhea, China. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 8, p. 1303–1305, 2010. Doi: 10.3201/eid1608.100087. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3298310/>. Acesso em 12 de agosto de 2020.

SILVA, A. M. B.; PRADO, R. R.; BOUTH, R. C.; ARAÚJO, S. G.; COSTA, K. S.; PEREIRA, A. C. L.; CARVALHO, D. C.; RIBEIRO, K. T. S.; HIRAI, K. E. Ocorrência de enteroparasitoses em comunidades ribeirinhas do Município de Igarapé Miri, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 4, p. 45–51, dez. 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232014000400006>. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2176-62232014000400006&lng=pt&nrm=iss. Acesso em 26 de Julho de 2021.

SIQUEIRA, J. D.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; CONTRERAS, M.; LANDER, O.; CABALLERO-ARIAS, H.; XUTAO, D.; NOYA-ALARCON, O.; DELWART, E. Complex virome in feces from Amerindian children in isolated Amazonian villages. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4270, 15 out. 2018. doi: 10.1038/s41467-018-06502-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-06502-9>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

STRASSER, B. J. Collecting, comparing, and computing sequences: the making of Margaret O. Dayhoff's Atlas of Protein Sequence and Structure, 1954-1965. **Journal of the History of Biology**, v. 43, n. 4, p. 623–660, 2010. doi: 10.1007/s10739-009-9221-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10739-009-9221-0>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

TAKAMATSU, P. H. T. ; BELEM, F. L. ; COUTO, B. A. D. . ANÁLISE DO HABITAR VERNACULAR NO AMBIENTE CONSTRUÍDO E SUA PRESERVAÇÃO: Estudo de caso da Vila do Elesbão/ Santana- AP.. In: IV Simpósio Nacional Sobre Pequenas Cidades ? IV

SINAPEQ, 2016, Ituitaba. **Anais do IV SINAPEQ**: Cidades pequenas: dinamicas, escalas e redes urbanas. Ituiutaba: Observatório das Cidades, 2016.

TATUSOV, R. L.; CHHABRA, P.; DIEZ-VALCARCE, M.; BARCLAY, L.; CANNON, J. L.; VINJÉ, J. Human Calicivirus Typing tool: A web-based tool for genotyping human norovirus and sapovirus sequences. **Journal of Clinical Virology**, v. 134, p. 104718, 1 jan. 2021. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104718. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1386653220304601?via%3Dihub>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

TORNER, N.; MARTINEZ, A.; BRONER, S.; MORENO, A.; CAMPS, N.; DOMÍNGUEZ, A. Epidemiology of Acute Gastroenteritis Outbreaks Caused by Human Calicivirus (Norovirus and Sapovirus) in Catalonia: A Two Year Prospective Study, 2010-2011. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0152503, 27 abr. 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0152503. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0152503>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

TOSTES, J. A.; FEIJÃO, A. J.; MOURA, C. I. R. A paisagem cultural da cidade de Macapá: o rio comanda a vida. **Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades**, v. 5, n. 34, 9 dez. 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.17271/2318847253420171619>. Disponível em: https://amigosdanatureza.org.br/publicacoes/index.php/gerenciamento_de_cidades/article/view/1619. Acesso em 26 de Julho de 2021.

TOSTES, J. A.; SOUZA, A. C. M.; FERREIRA, J. F. C. O Desenvolvimento Local Integrado entre as Cidades de Macapá e Santana (Estado do Amapá, Brasil). **PRACS: Revista Eletrônica de Humanidades do Curso de Ciências Sociais da UNIFAP**, v. 8, n. 2, p. 149–167, 1 jun. 2016. Disponível em: <https://periodicos.unifap.br/index.php/pracs/article/view/2326>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

VAN ETEN, J. L.; DUNIGAN, D. D. Chloroviruses: not your everyday plant virus. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 1, p. 1–8, jan. 2012. doi: 10.1016/j.tplants.2011.10.005. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/plant-science/fulltext/S1360-1385\(11\)00227-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1360138511002275%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/plant-science/fulltext/S1360-1385(11)00227-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1360138511002275%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em 26 de Julho de 2021.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. Virus species and virus identification: Past and current controversies. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 133–144, 1 jan. 2007. doi: 10.1016/j.meegid.2006.04.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134806000591?via%3Dihub>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

VANCHIERE, J. A.; CARILLO, B.; MORROW, A. L.; JIANG, X.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; BUTEL, J. S. Fecal Polyomavirus Excretion in Infancy. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 5, n. 2, p. 210–213, jun. 2016. doi: 10.1093/jpids/piu101. Disponível em: <https://academic.oup.com/jpids/article/5/2/210/2580055>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

VARSANI, A.; KRUPOVIC, M. Smacoviridae: a new family of animal-associated single-stranded DNA viruses. **Arch Virol**. 2018, 163, 2005–2015, doi:10.1007/s00705-018-3820-Z.

- VASCONCELOS, M. J. O. B.; RISSIN, A.; FIGUEIROA, J. N.; LIRA, P. I. C.; BATISTA FILHO, M. Doenças diarreicas e hospitalizações em menores de cinco anos no estado de Pernambuco, Brasil, nos anos de 1997 e 2006. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 3, p. 715–722, mar. 2018. <https://doi.org/10.1590/1413-81232018233.14872016>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/FWq9wCvQgBBpz4vcRnwZwRK/?lang=pt>. Acesso em 26 de Julho de 2021.
- VICTORIA, J. G.; KAPOOR A, LI, L.; BLINKOVA, O.; SLIKAS, B.; WANG, C.; NAEEM, A.; ZAIDI, S.; DELWART, E. Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. **Journal of Virology**, v. 83, n. 9, p. 4642–4651, 2009. Doi: 10.1128/JVI.02301-08. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19211756/>. Acesso em 12 de agosto de 2020.
- VINJÉ, J.; ESTES, M.K.; ESTEVES, P.; GREEN, K. Y.; KATAYAMA, K.; KNOWLES, N. J.; L'HOMME, Y.; MARTELLA, V.; VENNEMA, H.; WHITE, P.A. ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. **The Journal of General Virology**, v. 100, n. 11, p. 1469–1470, nov. 2019. doi: 10.1099/jgv.0.001332. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001332>. Acesso em 26 de Julho de 2021.
- VU, D. L.; CORDEY, S.; BRITO, F.; KAISER, L. Novel human astroviruses: Novel human diseases? **J Clin Virol.** v. 82, p. 56–63, set. 2016. doi: 10.1016/j.jcv.2016.07.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653216301743?via%3Dihub>. Acesso em 26 de Julho de 2021.
- WATANABE, A. S. A.; LUCHS, A.; LEAL, É.; MILAGRES, F. A. P.; KOMNINAKIS, S. V.; GILL, M. C. A. B. S.; BRUSTULIN, R.; CHAGAS, R. T.; ABRÃO, M. F. N. D. S.; SOARES, C. V. D. A.; DENG, X.; SABINO, E. C.; DELWART, E.; COSTA, A. C. Complete Genome Sequences of Six Human Bocavirus Strains from Patients with Acute Gastroenteritis in the North Region of Brazil. **Genome Announcements**, v. 6, n. 17, 26 abr. 2018. doi: 10.1128/genomeA.00235-18. PMID: 29700140; PMCID: PMC5920168. Doi: 10.1128/genomeA.00235-18 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5920168/> Acesso em 12 de agosto de 2020.
- WOOLEY, J. C.; GODZIK, A.; FRIEDBERG, I. A primer on metagenomics. **PLoS computational biology**, v. 6, n. 2, p. e1000667, 26 fev. 2010. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000667. Disponível em: <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1000667>. Acesso em 26 de Julho de 2021.
- WOOLHOUSE, M.; SCOTT, F.; HUDSON, Z.; HOWEY, R.; CHASE-TOPPING, M. Human viruses: discovery and emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1604, p. 2864–2871, 19 out. 2012. doi: 10.1098/rstb.2011.0354. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2011.0354>. Acesso em 26 de Julho de 2021.
- Yu, J. M.; Ao, Y. Y.; Liu, N.; Li, L. L.; Duan, Z. J. Salivirus in Children and Its Association with Childhood Acute Gastroenteritis: A Paired Case-Control Study. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0130977, 2015. doi: 10.1371 / journal.pone.0130977. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130977>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

ZHAO, L.; ROSARIO, K.; BREITBART, M.; DUFFY, S. Eukaryotic Circular Rep-Encoding Single-Stranded DNA (CRESS DNA) Viruses: Ubiquitous Viruses With Small Genomes and a Diverse Host Range. **Adv. Virus Res.** 2019, 103, 71–133, doi:10.1016/bs.aivir.2018.10.001.

ZELL, R.; DELWART, E.; GORBALENYA, A. E.; HOVI, T.; KING, A. M. Q.; KNOWLES, N. J.; LINDBERG, A. M.; PALLANSCH, M. A.; PALMENBERG, A. C.; REUTER, G.; SIMMONDS, P.; SKERN, T.; STANWAY, G.; YAMASHITA, T.; ICTV REPORT CONSORTIUM. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. **The Journal of General Virology**, v. 98, n. 10, p. 2421–2422, out. 2017. doi: 10.1099/jgv.0.000911. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000911>. Acesso em 26 de Julho de 2021.

Anexo 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS POR MEIO DA TÉCNICA DE METAGENÔMICA EM COMUNIDADES RIBEIRINHAS DO MUNICÍPIO DE SANTANA-AP.

Pesquisador: EVERSON DOS SANTOS DAVID

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15063219.1.0000.0003

Instituição Proponente: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.446.167

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer anterior

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e exequível

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de acordo com a resolução 466/2012 e 510/2016

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Se pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rodovia Juscelino Kubistcheck de Oliveira - Km.02
Bairro: Bairro Universidade **CEP:** 68.902-280
UF: AP **Município:** MACAPÁ
Telefone: (96)4009-2805 **Fax:** (96)4009-2804 **E-mail:** cepi@unifap.br

Continuação do Parecer: 3.446.167

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1364063.pdf	09/07/2019 11:16:29		Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	09/07/2019 11:09:08	EVERSON DOS SANTOS DAVID	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetodeMestrado.pdf	09/07/2019 10:52:15	EVERSON DOS SANTOS DAVID	Aceito
Outros	questionario.pdf	09/07/2019 10:47:49	EVERSON DOS SANTOS DAVID	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	28/05/2019 20:26:15	EVERSON DOS SANTOS DAVID	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TC.pdf	28/05/2019 20:25:29	EVERSON DOS SANTOS DAVID	Aceito
Outros	AnuenciaUNIFESP.pdf	28/05/2019 14:15:27	EVERSON DOS SANTOS DAVID	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

MACAPA, 09 de Julho de 2019

Assinado por:
RAPHAELLE SOUSA BORGES
(Coordenador(a))

Endereço: Rodovia Juscelino Kubistcheck de Oliveira - Km.02
Bairro: Bairro Universidade **CEP:** 68.902-280
UF: AP **Município:** MACAPA
Telefone: (96)4009-2805 **Fax:** (96)4009-2804 **E-mail:** cep@unifap.br



UNIFESP - HOSPITAL SÃO
PAULO - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - HSP/UNIFESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS POR MEIO DA TÉCNICA DE METAGENÔMICA EM COMUNIDADES RIBEIRINHAS DO MUNICÍPIO DE SANTANA-AP.

Pesquisador: EVERSON DOS SANTOS DAVID

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 15063219.1.3001.5505

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.689.032

Apresentação do Projeto:

Projeto CEP/UNIFESP n:1135/2019 (centro coparticipante)

Na UNIFESP (centro coparticipante) a pesquisadora responsável é Dra. Shirley Cavalcante Vasconcelos. Projeto vinculado ao Departamento de Medicina, Campus São Paulo, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP.

-Trata-se de projeto de mestrado do aluno EVERSON DOS SANTOS DAVID, que realiza seu mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá - UNIFAP sob orientação de Dr. Raimundo Nonato Picanço Souto e Coorientação de Dra. Shirley Cavalcante Vasconcelos.

-Centro Coordenador: UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ - UNIFAP

-As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa

(PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1395186.pdf, gerado em 15/10/2019)

APRESENTAÇÃO: É notável nas grandes cidades, que a ausência de saneamento básico é um fator

Endereço: Rua Botucatu, 740. 5º andar Sala 557

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: cep@unifesp.br



UNIFESP - HOSPITAL SÃO
PAULO - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - HSP/UNIFESP



Continuação do Parecer: 3.689.032

determinante para a má qualidade de vida. Implica diretamente nas políticas públicas de infraestrutura de uma determinada região, na disponibilização de água potável para a população, e nas condições sanitárias adequadas. Esta vulnerabilidade é visível, e afeta principalmente indivíduos acometidos por doenças diarreicas, apresentando agentes infecciosos ainda não identificados por métodos tradicionais, entre aqueles agentes etiológicamente relacionados aos vírus, que dificultam diagnósticos claros relacionados a ocorrências de diarreia, e nas estratégias epidemiológicas que promovam ações de prevenção a partir do conhecimentos destes agentes. Nesta perspectiva, este projeto objetiva identificar novos vírus em amostras de fezes diarreicas, em indivíduos de comunidade ribeirinhas do município de Santana – AP, por meio da técnica de metagenômica. O roteiro metodológico seguirá partindo da coleta do material fecal, seguindo um rigor ético, e um protocolo preciso para a armazenagem e transporte das amostras, de forma que se mantenha os vírus ativos. Em laboratório, as amostras serão submetidas a semi-purificação, na extração e amplificação do RNA e DNA, na preparação das bibliotecas de metagenômica viral, sequenciamento, e na análise de dados por bioinformática. Neste contexto, este projeto tende a contribuir diretamente para os avanços das pesquisas em metagenôma viral na Amazônia, além de discernir os surtos de diarreia, e associando adequadamente com seus agentes etiológicos, apresentando se de forma inovadora e pioneira nesta região.

-HIPÓTESE: É bastante comum associar os casos de diarreia ao rotavírus, no entanto as rotavíroses passaram a ser prevenidas por meio da vacinação, e é possível que outros agentes virais possam estar causando diarreias, partindo do pressuposto que a etiologia de muitas doenças humanas é desconhecida, destas mais de 50% dos casos a etiologia é ignorada. Os avanços chegaram com os sequenciadores de nova geração, facilitando as pesquisas e promovendo descobertas significativas através da metagenômica viral.

Objetivo da Pesquisa:

-OBJETIVO PRIMÁRIO: Identificar vírus em amostras de fezes com morbidade em diarreia de indivíduos de comunidades ribeirinhas do município de Santana - AP, por meio da técnica de metagenômica.

-OBJETIVO SECUNDÁRIO: Coletar amostras fecais de indivíduos com morbidade em diarreia; Processamento das amostras fecais; Realizar o sequenciamento genômico dos vírus presentes nas amostras fecais de indivíduos; Analisar as sequências virais obtidas com as contidas em banco de

Endereço: Rua Botucatu, 740. 5º andar Sala 557

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: cep@unifesp.br

Continuação do Parecer: 3.689.032

dados genômicos, utilizando ferramentas de bioinformática.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos e benefícios, o pesquisador declara:

-Riscos:

O único risco de participação nesta pesquisa é constrangimento na disponibilização da amostra fecal.

-Benefícios:

Os benefícios da pesquisa implica na colaboração no desenvolvimento de vacinas, bem como o desenvolvimento de futuras drogas antivirais, assim como estudo da diversidade viral na região, partindo da necessidade de contribuir com futuros trabalhos científicos, formando uma base literária coesa e robusta, além de atribuir valor social.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

TIPO DE ESTUDO: Será utilizada a abordagem qualitativa com o intuito apenas de identificar a diversidade de vírus relacionados com a ocorrência de diarreia aguda.

LOCAL: Laboratório de Retrovirologia, UNIFESP.

PARTICIPANTES: Coleta do material fecal Serão coletadas 100 amostras dividas entre as cinco comunidades já apresentadas acima, entretanto 50 amostras serão coletadas no período chuvoso e outras 50 amostras serão coletadas no período menos chuvoso.

PROCEDIMENTOS: O roteiro metodológico seguirá partindo da coleta do material fecal, seguindo um rigor ético, e um protocolo preciso para a armazenagem e transporte das amostras, de forma que se mantenha os vírus ativos. Em laboratório, as amostras serão submetidas a semi-purificação, na extração e amplificação do RNA e DNA, na preparação das bibliotecas de metagenômica viral, sequenciamento, e na análise de dados por bioinformática.

PROCEDIMENTO NA UNIFESP: o material coletado no centro coordenador será transportado até o Laboratório de Retrovirologia, UNIFESP onde serão realizadas as análises. Não haverá coleta de pacientes da UNIFESP.

(mais informações, ver projeto detalhado).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1- Foram apresentados os principais documentos: folha de rosto; projeto completo; cópia do

Endereço: Rua Botucatu, 740. 5º andar Sala 557		
Bairro: VILA CLEMENTINO	CEP: 04.023-900	
UF: SP	Município: SÃO PAULO	
Telefone: (11)5571-1062	Fax: (11)5539-7162	E-mail: cep@unifesp.br



Continuação do Parecer: 3.689.032

cadastro CEP/UNIFESP, orçamento financeiro e cronograma apresentados adequadamente.

2- TCLE a ser aplicado aos participantes.

3- outros documentos importantes anexados na Plataforma Brasil:

a)- (Esclarecimento.pdf, postado em 15/10/2019)

b)- anuência da Dra. Shirley Cavalcante Vasconcelos (AnuenciaUNIFESP.pdf, postado em 28/5/2019)

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (semestralmente), e o relatório final, quando do término do estudo, por meio de notificação pela Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1395186.pdf	15/10/2019 17:50:02		Aceito
Outros	Esclarecimento.pdf	15/10/2019 17:48:56	Shirley Cavalcante Vasconcelos	Aceito
Outros	Cadastro.pdf	15/10/2019 17:48:35	Shirley Cavalcante Vasconcelos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Mestrado.pdf	09/07/2019 10:52:15	EVERSON DOS SANTOS DAVID	Aceito
Outros	questionario.pdf	09/07/2019 10:47:49	EVERSON DOS SANTOS DAVID	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TC.pdf	28/05/2019 20:25:29	EVERSON DOS SANTOS DAVID	Aceito

Endereço: Rua Botucatu, 740. 5º andar Sala 557

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: cep@unifesp.br



UNIFESP - HOSPITAL SÃO
PAULO - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - HSP/UNIFESP



Continuação do Parecer: 3.689.032

Ausência	TC.pdf	28/05/2019 20:25:29	EVERSON DOS SANTOS DAVID	Aceito
Outros	AnuenciaUNIFESP.pdf	28/05/2019 14:15:27	EVERSON DOS SANTOS DAVID	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 06 de Novembro de 2019

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Botucatu, 740. 5º andar Sala 557
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** cep@unifesp.br

Anexo 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
(Resolução 466/2012 CNS/CONEP)**

O Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado "identificação de vírus entéricos por meio da técnica de Metagenômica, em comunidades ribeirinhas do município de Santana-AP". O objetivo deste trabalho é identificar vírus em amostras de fezes com morbidade em diarreia de indivíduos de comunidades ribeirinhas do município de Santana - AP por meio da técnica de metagenômica. Para realizar o estudo será necessário que o(a) Sr.(a) se disponibilize a participar respondendo um questionário sócio econômico e na disponibilização de uma amostra fecal para análise laboratorial. Uma pequena quantidade da sua amostra fecal será encaminhada São Paulo no Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo, onde será feito uma análise a presença de vírus. Esta análise será feita pela Dra, Shirley Cavalcante Vasconcelos Komninakis. A Dra, Shirley vai usar números para identificar sua amostra não expondo sua identificação, sendo que qualquer dúvida você pode entrar em contato com ela pelos contatos descritos no final deste termo. Para a instituição e para sociedade, esta pesquisa servirá como parâmetro para avaliar possíveis alterações genéticas de vírus relacionado a diarreia. Os riscos da sua participação nesta pesquisa é constrangimento na disponibilização da amostra fecal, em virtude das informações coletadas serem utilizadas unicamente com fins científicos, sendo garantidos o total sigilo e confidencialidade, através da assinatura deste termo, o qual o(a) Sr.(a) receberá uma cópia.

Os benefícios da pesquisa implica na colaboração no desenvolvimento de vacinas, bem como o desenvolvimento de futuras drogas antivirais, assim como estudo da diversidade viral na região, partindo da necessidade de contribuir com futuros trabalhos científicos, formando uma base literária coesa e robusta, além de atribuir valor social.

O(a) Sr.(a) terá o direito e a liberdade de negar-se a participar desta pesquisa total ou parcialmente ou dela retirar-se a qualquer momento, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo com relação ao seu atendimento nesta instituição, de acordo com a Resolução CNS nº466/12 e complementares.

Para qualquer esclarecimento no decorrer da sua participação, estarei disponível através dos telefones: (96)981247900 (celular), (96)984113712. O senhor (a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amapá Rodovia JK, s/n – Bairro Marco Zero do Equador - Macapá/AP, para obter informações sobre esta pesquisa e/ou sobre a sua participação, através dos telefones 4009-2804, 4009- 2805. Para entrar em contato com a Dra. Shirley o senhor (a) pode telefonar para (11) 5579-4834 que está no endereço, Prédio de Pesquisa I, Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo, Rua Pedro de Toledo, 781 – 16º andar, Bairro: Vila Clementino, São Paulo/SP e também pode entrar em contato com o CEP/UNIFESP (Rua Prof. Francisco de Castro, n: 55, 04020-050, tel: 011-5571-1062; 011-5539-7162, E-mail é: CEP@unifesp.edu.br.

Desde já agradecemos!

Eu _____ (nome por extenso) declaro que após ter sido esclarecido (a) pela pesquisador, lido o presente termo, e entendido tudo o que me foi explicado, concordo em participar da Pesquisa intitulada "identificação de vírus entéricos por meio da técnica de Metagenômica, em comunidades ribeirinhas do município de Santana- AP".

Macapá, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do Pesquisador
Everson dos Santos David
Universidade Federal do Amapá
Cel: (96) 981247900
e-mail: Everson.david@hotmail.com

Assinatura do paciente



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ

Caso o paciente esteja impossibilitado de assinar:

Eu _____, abaixo assinado, confirmo a leitura do presente termo na íntegra para o(a) paciente _____, o(a) qual declarou na minha presença a compreensão plena e aceitação em participar desta pesquisa, o qual utilizou a sua impressão digital (abaixo) para confirmar a participação.



Polegar direito (caso não assine).

Testemunha n°1: _____

Testemunha n°2: _____

Anexo 3 – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DOS RESPECTIVOS PERIÓDICOS



ACTA TROPICA

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.2
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0001-706X

DESCRIPTION

Acta Tropica, is an international journal on infectious diseases that covers public health sciences and biomedical research with particular emphasis on topics relevant to human and animal health in the tropics and the subtropics.

Its scope includes the biology of pathogens and vectors, host-parasite relationships, mechanisms of pathogenicity, clinical disease and treatment, and we welcome contributions in basic or applied research in disciplines such as epidemiology, disease ecology, diagnostics, interventions and control, mathematical modeling, public health and social sciences, climate change, parasite and vector taxonomy, host and parasite genomics, biochemistry and immunology and vaccine testing.

Contributions may be in the form of original research papers, review articles, short communications, opinion articles, or letters to the Editors.

Only manuscripts of high scientific significance and innovation will be considered for publication. Manuscripts of minimal international relevance, case reports, and control strategies at very early inconclusive laboratory stages of development will not be considered for publication.

Important Guidelines for Acceptance

Editors and the Editorial Board of *Acta Tropica* provide the following guidelines to help authors prepare manuscripts of high quality that can be considered for publication. Maximize your chances of acceptance by making sure your manuscript: Matches the scientific scope of the journal, Presents results that significantly advance science including innovative new approaches, Meets quality standards of presentation and literature citation, Demonstrates potential health or biomedical impact.

The above points are critical for publication of original papers. Be aware Editors carefully evaluate initial manuscript submissions and only those meeting the above criteria will be forwarded to review. If reviewed favorably and the authors seriously address all concerns, than chances of acceptance are increased. Review papers, in addition, are expected to carefully synthesize the literature and make recommendations to advance respective scientific fields.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Acta Tropica publishes original research papers, short communications, review articles and letter to the editor. Original papers **should normally not exceed 10 printed pages** including tables and figures. Short communications should not exceed 4 printed pages including tables and figures. Manuscripts must be accompanied by a letter signed by all the authors. Submission of a paper to *Acta Tropica* is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. The act of submitting a manuscript to *Acta Tropica* carries with it the right to publish the paper. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors. Letters to the Editor is considered for publication provided it does not contain material that has been submitted or published elsewhere. The text, not including references, must not exceed 1000 words. The letter can have one figure or small table. When a letter refers to an article recently published in *Acta Tropica*, the opportunity for reply will be given to the authors of the original article. Such a reply will be published along with the letter. Start the letter with "Dear Editor".

Types of Paper

Acta Tropica publishes the following types of papers:

1. *Original research articles*
2. *Short Communications*
3. *Review articles*
4. *Opinion articles*
5. *Letters to the Editor*

Original research articles should report highly significant innovative results not previously published elsewhere. Original articles are limited to 7,000 words per article (all text excluding tables and figure legends).

Short Communications should consist of original results or new methods within the scope of the journal. Short Communications need not be formally structured as full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension. Short Communications are limited to 3,000 words per article (all text excluding tables and figure legends).

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited by the Editors in Chief. Review articles should include insightful recommendations for future directions needed for achieving public health impacts. Review articles are limited to 15,000 words per article (all text excluding tables and figure legends).

Opinion articles should include scientifically backed points of view regarding currently relevant, controversial or future-oriented topics pertinent to the scope of *Acta Tropica*. Note that only outlining recent advances in a given field is not acceptable for an Opinion article for *Acta Tropica*. Besides stimulating scientific discussion or future research, opinion articles should provide a novel conceptual framework for an old or timely issue. The authors should outline which research directions should be prioritized and highlight specific points explaining why they should be prioritized in the forthcoming years to achieve public health impact. Opinion articles are limited to 6,000 words per article (all text excluding tables and figure legends).

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcome. Letters on "hot topics" about parasite and vector biology, ecology, as well as epidemiology, control of infections, and public health are also welcome. Note that Letters to the Editors will also be externally reviewed but the decision to publish submitted letters rests with the Editors in Chief. A goal is to publish constructive letters that will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers. Letters to the Editor are limited to 2,000 words per article (all text excluding tables and figure legends).

Special Issues

Special issues represent the state of the art and recent advances in the knowledge of selected topics fitting within the scope of *Acta Tropica*. The addressed topics cover basic or applied research on epidemiology, intervention and control of parasitic infections, global health, pathogenicity, innovative technology in diagnostics, biology of pathogens and vectors as well as on advances in the understanding of host-parasite relationships. The original research, review and opinion articles in Special Issues are composed by invited leading scientists in their respective fields and are curated by Guest Editors in cooperation with the Editors in Chief. Inquiries regarding ideas for new Special issues should be addressed to any of the Editors in Chief.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association \(Declaration of Helsinki\)](#) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex](#) and [gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of competing interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of competing interest statement using [this template](#) and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. **Note: Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.** If there are no interests to declare, please choose the first option in the template. [More information.](#)

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources;

Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Authors must send the names, addresses and email addresses of at least 3 potential reviewers for this manuscript meeting the following criteria: They must be experts or active workers in the field; They must not be from the same university; They must not be current or prior mentors or collaborators;

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

Please submit the manuscript with double line spacing and with continuous line numbering.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Please submit the manuscript with double line spacing and with continuous line numbering.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Please provide, when submitting your article, a graphical abstract. This comprises the title, authors and affiliations, identical to the article itself, a summary of about 25 words, and a pictogram: one figure representative of the work described. Maximum image size: 400 × 600 pixels (h × w, recommended size 200 × 500 pixels). Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Illustration services

Elsevier's Author Services offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/acta-tropica>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For

more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

New Zoological Taxa

Acta Tropica supports the work of ZooBank, the Official Register of the International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN). If your article includes a nomenclatural act you must register the publication of the article with ZooBank, once the article has been accepted by a journal and goes into production. Please include the DOI (digital object identifier) provided by the journal as part of your registration. Details of how to do this are given here and can also be found on the ZooBank website.

How to register your work at Zoobank:

If your paper has been accepted for publication visit [ZooBank](#). Here you can access your account, or create a new account if you do not already have one. Click on "register content". You must then select the publication status 'This work has not yet been published', and then enter the required mandatory details (author names, article title, journal, etc.) Your paper will then be assigned an LSID code. This code should be added to your article proofs (placed immediately after "abstract" before "keywords") to ensure that the LSID will be included in your published paper. Once your paper is published online log back into Zoobank. Select publication status "This work has already been published" and include the date of publication and any other details (such as issue, volume, page extent, etc.) Your paper is now formally registered in Zoobank and this ensures that it is officially recorded as the first paper to describe this species.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

Anexo 4 – OUTROS ANEXOS ESPECÍFICOS DA PESQUISA

FORMULÁRIO SOCIOECONÔMICO, DEMOGRÁFICO, CULTURAL AMBIENTAL.
Adaptado de Menezes (2013)
“IDENTIFICAÇÃO DE VIRUS ENTÉRICOS POR MEIO DA TÉCNICA DE METAGENÔMICA,
EM COMUNIDADES RIBEIRINHAS DO MUNICÍPIO DE SANTANA- AP.”

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME _____
DATA NASC. ____/____/____ IDADE _____
NOME DA MÃE _____
ENDEREÇO: _____ TEL. _____
LOCALIDADE _____ MUNICÍPIO _____

1 LOCALIZAÇÃO DA MORADIA

() Área de Ressaca; () Terra Firme

2 TIPO DE MORADIA

() Madeira; () Alvenaria; () Mista; (...) Outros _____

NÚMERO DE CÔMODOS _____

3 CASA:

() Própria; () Alugada; () Cedida; () Outros
Especifique: _____

4 RESIDENTES NO DOMICÍLIO:

() até 3; () 04 a 06; () Acima de 7.

5 PRESENÇA DE TERRENOS BALDIOS COM LIXO, PRÓXIMO A RESIDÊNCIA

() sim () não

6 MEIOS DE COMUNICAÇÃO

() Televisão; () Rádio; () Jornais/revistas; () Telefone; () Internet; () Outros

7 GRAU DE ESCOLARIDADE DOS RESPONSÁVEIS:

() Não Alfabetizado; () Ensino fundamental Incompleto; () Ensino fundamental Completo; () Ensino médio Incompleto; () Ensino médio Completo; () Ensino Superior Incompleto; () Ensino superior Completo.

8 RENDA FAMILIAR

() Menor que 1 salário; () 1 Salário mínimo; () 2 a 4 Salários mínimos; () 5 a 7 Salário mínimos () acima de 7 Salários mínimos.

9 GRUPO ÉTNICO (COR)

() Branco; () Pardo; () Negro; () Indígena; () Amarelo

10 PRESENÇA DE ANIMAIS DOMÉSTICOS

() Sim. Especifique: () Cachorro; () Gato; () Outros; _____ () Não

11 ATIVIDADES DE LAZER

() Nadar em rios; () Brincar em praça pública; () Brincar em tanques de areia; () outras. Especifique: _____

12 TRATAMENTO DA ÁGUA NO DOMICÍLIO.

() Sim :Especifique: () Hipoclorito; () Coar; () Ferve; () Filtro; () Outros _____ () Não

13 UTILIZAÇÃO DA ÁGUA PARA CONSUMO

() água encanada; () água mineral; () água de poço amazonas; () água de poço artesiano; () outros. Especifique: _____

14 LAVAGEM DAS MÃOS ANTES DA REFEIÇÃO

()sim; () não; () As vezes

15 LAVAGEM DAS MÃOS APÓS USAR O BANHEIRO

() sim; () não; () As vezes

16 HÁBITO DE ANDAR DESCALÇO

() sim; () não; () As vezes

17 CONSISTÊNCIA DAS FEZES

() Líquida; () Pastosa; () Rígida

18 DESTINO DAS FEZES

() área aberta; () esgoto; () fossa biológica; () fossa negra; () vala; () rio/riacho; () outros. Especifique: _____

19 DESTINO DO LIXO

() Coletado; () Queimado; () Enterrado; () Céu aberto

20 REALIZA EXAME DE ROTINA

() periodicamente; () às vezes; () dificilmente; () nunca fez

21 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS RELACIONADAS À PROVÁVEL INFECÇÃO PARASITÁRIA INTESTINAL

() Dor de barriga e cólicas; () Falta de apetite; () Diarréia; () Flatulência (gases); () Indisposição; () Vômitos; () Emagrecimento; () Náuseas; () Fraqueza; () Eliminação de vermes; () Febre Persistente; () Prurido anal; () Cefaléia; () Obstipação intestinal; () Manchas na pele; () Evacuações/dia _____