

RAQUEL CIRLENE DA SILVA

**INFECÇÕES VIRAIS ENTÉRICAS EM
PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS**



**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Raquel Cirlene da Silva

**INFECÇÕES VIRAIS ENTÉRICAS EM PACIENTES
IMUNOCOMPROMETIDOS**



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientador: Norma Suely de Oliveira Santos



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
JULHO DE 2008

Silva, Raquel Cirlene da
Infecções Virais Entéricas em Pacientes Imunocomprometidos/
Raquel Cirlene da Silva – Rio de Janeiro, 2008
XVI, 102
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia
Prof. Paulo de Góes, 2008.

Orientador: Norma Suely de Oliveira Santos

Referências bibliográficas: f 72-100

1. Diarréia 2. Enterites 3. Imunodeficiência 4. Diagnóstico
Viroológico 5. Diagnóstico Molecular 6. Epidemiologia I. Santos
Norma. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes,
Mestrado em Ciências Biológicas. III. Infecções Virais Entéricas em
Pacientes Imunocomprometidos

Raquel Cirlene da Silva

**INFECÇÕES VIRAIS ENTÉRICAS EM PACIENTES
IMUNOCOMPROMETIDOS**

Rio de Janeiro, 16 de julho de 2008

Norma Suely de Oliveira Santos, Doutora, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

José Mauro Peralta, Doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Luciana Jesus da Costa, Doutora, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Caroline Cordeiro Soares, Doutora, Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

José Nelson dos Santos Silva Couceiro, Doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Viroses Respiratórias, Entéricas e Oculares do Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do(a) Prof(a) Norma Suely de Oliveira Santos.

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço por me acompanhar em todos os momentos, me fazendo perceber e sentir a Sua presença em minha vida.

A minha orientadora Professora Norma Suely de Oliveira Santos, pela orientação, por compartilhar seus conhecimentos, pelo incentivo, pelo respeito, pela alegria e cordialidade dispensadas.

Ao Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, por conceder tempo disponível para realização das atividades inerentes a esse trabalho.

Ao Dr. Roberto Almada Horta, Chefe do Serviço de Patologia Clínica do HUCFF, pela autorização e incentivos concedidos.

Ao Professor Fernando Portela Câmara pelo auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Microbiologia *Prof. Paulo de Góes* e ao Departamento de Virologia, representados pela Professora Thaís Souto-Padron, Coordenadora

de Pós-Graduação, Professora Agnes Marie de Sá Figueiredo, Diretora do IMPPG e Professor Davis Fernandes Ferreira, Chefe do Departamento de Virologia.

Aos amigos e colegas de trabalho por tanto carinho, compreensão e ajuda em todos os momentos.

Aos mestres: “O mestre que caminha à sombra do tempo, rodeado de discípulos, não dá de sua sabedoria, mas sim de sua fé e de sua ternura. Se for verdadeiramente sábio, não te convidará a entrar na mansão de seu saber, mas antes te conduzirá ao limiar de tua própria mente”. Agradeço por repartir seus conhecimentos, disponibilizando as ferramentas com as quais podemos abrir novos horizontes, rumo aos ideais humanos e profissionais.

A minha mãe, que sempre me apoiou e incentivou, permitindo que eu permanecesse com fé para alcançar meus objetivos. A você que se doou por inteiro, por opção e amor e renunciou aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus: Muito obrigada, pois sem você eu não chegaria aqui.

A José Ricardo Ventura Corrêa, pelo carinho, compreensão e incentivo transmitidos em todos os momentos.

Dedico este Trabalho a todas as pessoas que não tiveram a oportunidade de prosseguir nos estudos. Que um dia essa realidade do nosso meio possa mudar para que as pessoas possam realizar seus sonhos e objetivos.

Raquel Cirlene da Silva

INFECÇÕES VIRAIS ENTÉRICAS EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS

Orientador: Norma Suely de Oliveira Santos

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

RESUMO

As infecções gastrointestinais são mais comuns e mais graves em indivíduos imunocomprometidos e podem afetar todo o trato gastrointestinal, desde infecções da orofaringe até infecções do cólon e ânus. As causas de diarreia em indivíduos imunossuprimidos são multifatoriais e incluem drogas antiretrovirais, imunomoduladores, álcool e outras causas não infecciosas, assim como infecções sistêmicas. Neste trabalho foram analisadas 150 amostras fecais de pacientes imunocomprometidos atendidos no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da UFRJ, utilizando-se a técnica de PCR. O principal objetivo desta análise foi avaliar a importância de enterites virais em indivíduos imunocomprometidos atendidos no HUCFF, avaliando a ocorrência de infecções entéricas causadas por citomegalovírus (CMV), herpes simplex vírus (HSV) tipos 1 e 2, vírus Epstein-Barr (EBV), adenovírus (AdV), bocavírus humano (HBoV), rotavírus (RV), norovírus (NoV) e astrovírus (AstV), nesses pacientes. Buscou-se também avaliar a importância de técnicas moleculares, no auxílio ao diagnóstico das infecções virais entéricas.

Dentre as 150 amostras pesquisadas, 43 foram positivas para vírus, 27 positivas para parasitas e 90 foram negativas para todos os patógenos pesquisados. Para dez amostras, foi observada a co-infecção parasitária e viral.

Nenhum vírus com genoma de RNA foi detectado. Já entre os demais, com genoma de DNA, foram detectadas 43 amostras positivas (28,7%): 34 amostras foram positivas para CMV (79,1%), 3 amostras foram positivas para HSV-1 (7%), 1 amostra positiva para HSV-2 (2,3%), 1 amostra positiva para AdV (2,3%) e 1 amostra positiva para HBoV (2,3%). Ocorreram três casos de co-infecção (7%) (2 CMV associado a AdV, 1 caso CMV associado a HBoV). Não houve casos positivos para EBV.

A partir desses dados podemos inferir que: As infecções virais entéricas são freqüentes em pacientes imunocomprometidos; O CMV foi o patógeno viral encontrado com maior freqüência em pacientes imunocomprometidos; A implementação de uma rotina de diagnóstico molecular, para detecção precisa e rápida de patógenos virais, contribuiria para um melhor prognóstico e recuperação de pacientes por ele acometidos; A rotina de testagem das amostras deve priorizar a pesquisa de vírus de DNA, tais como CMV, HSV e AdV, por serem estes os mais comumente detectados em pacientes imunossuprimidos, com quadro de diarreia.

Palavras-chave: Diarreia, Enterites, Imunodeficiência, Diagnóstico Viroológico, Diagnóstico Molecular, Epidemiologia.

Rio de Janeiro
Julho de 2008

Raquel Cirlene da Silva
INFECÇÕES VIRAIS ENTÉRICAS EM PACIENTES
IMUNOCOMPROMETIDOS

Orientador: Norma Suely de Oliveira Santos

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

ABSTRACT

Gastrointestinal infections are more common and more severe in immunocompromised individuals and may affect the whole gastrointestinal tract, from infections of the oropharynx to infection of the distal colon and anus. The causes of diarrhea in the immunosuppressed are often multifactorial and include antiretroviral drugs, immunomodulators, alcohol and other noninfectious causes, as well as the effects of systemic infections. In the present study 150 fecal specimens collected from immunocompromised individuals treated at the Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) at UFRJ, were analyzed by PCR. The goal was to evaluate the importance of viral enteritis among those patients by determining the occurrence of infections caused by cytomegalovirus (CMV), herpes simplex virus (HSV) types 1 and 2, Epstein-Barr virus (EBV), adenovirus (AdV), bocavirus (HBoV), rotavirus (RV), norovirus (NoV) and astrovirus (AstV). We also intended to evaluate the importance of performing molecular techniques for diagnosis of enteric viral infection among immunocompromised patients.

Forty-three out of 150 samples tested, were positive for viral infections, 27 were positive for parasites and 90 samples were negative. Ten samples (collected from nine patients) presented a mixed infection of virus and parasites.

No RNA virus was detected. As among the DNA virus, 43 samples collected from 42 patients were positive, with 28.7% positivity: 34 samples were positive for CMV (79.1%), 3 positive for HSV-1 (7%), one (2.3%) each HSV-2, AdV and HBoV. For three samples there was a coinfection of virus and parasites. EBV was not detected in the study.

In conclusion, (i) enteric infections caused by virus are common among immunocompromised patients; (ii) CMV was the most common pathogen detected, regardless of the type of immunosuppression; (iii) the routine application of molecular methodologies for viral detection might contribute for a better recovery and better prognosis of such patients; (iv) an algorithm for viral testing in fecal specimens in immunocompromised patients should prioritize the detection of DNA virus such as CMV, HSV, AdV and HBoV over RNA virus.

Keywords: Diarrhea, Enteritis, Immunodeficiency, Viral Diagnostic, Molecular Diagnostic, Epidemiology.

Rio de Janeiro
Julho de 2008

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2.0. Citomegalovírus (CMV) | 5 |
| 2.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de CMV em Imunocomprometidos.... | 7 |
| 3.0. Vírus Herpes Simplex (HSV) tipos 1 e 2..... | 9 |
| 3.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de HSV em Imunocomprometidos..... | 11 |
| 4.0. Vírus Epstein-Barr (EBV)..... | 12 |
| 4.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de EBV em Imunocomprometidos..... | 13 |
| 5.0. Adenovírus (AdV)..... | 14 |
| 5.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de AdV em Imunocomprometidos..... | 16 |
| 6.0. Bocavírus de Humanos (HBoV)..... | 18 |
| 6.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de HBoV em Imunocomprometidos... | 20 |
| 7.0. Rotavírus (RV)..... | 20 |
| 7.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de RV em Imunocomprometidos..... | 22 |
| 8.0. Norovírus (NoV)..... | 23 |
| 8.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de NoV em Imunocomprometidos..... | 27 |
| 9.0. Astrovírus (AstV)..... | 28 |
| 9.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de AstV em Imunocomprometidos.... | 30 |
| 10.0. Diagnóstico Laboratorial das Infecções Entéricas..... | 31 |
| 11. OBJETIVOS..... | 33 |
| 12. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 34 |
| 12.1. Amostras Clínicas..... | 34 |
| 12.2. Aspectos Éticos..... | 34 |
| 12.3. Critérios de Inclusão e Exclusão..... | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 12.3.1. Critérios de Inclusão..... | 34 |
| 12.3.2. Critérios de Exclusão..... | 35 |
| 12.4. Definição de Termos..... | 35 |
| 12.5. Metodologia Para Realização dos EPF e Coprocultura..... | 35 |
| 12.6. Criação do Banco de Dados..... | 36 |
| 12.7. Controles Positivos..... | 36 |
| 12.8. Detecção de Vírus Com Genoma RNA..... | 37 |
| 12.8.1. Extração do RNA Viral..... | 37 |
| 12.8.2. Detecção de RNA viral através de RT-PCR..... | 38 |
| 12.9. Detecção de Vírus com Genoma DNA..... | 39 |
| 12.9.1. Extração de DNA viral..... | 39 |
| 12.9.2. Detecção de DNA viral através de PCR..... | 40 |
| 12.9.3. Reação de semi-quantificação do DNA de HBoV..... | 41 |
| 12.10. Seqüenciamento dos produtos amplificados para confirmação dos vírus detectados..... | 41 |
| 12.10.1. Purificação do produto obtido na PCR..... | 42 |
| 12.10.2. Quantificação do produto da PCR purificado..... | 42 |
| 12.10.3. Reação de seqüenciamento (<i>Cycle Sequencing</i>)..... | 43 |
| 12.10.4. Análise das seqüências..... | 43 |
| 12.11. Análise Estatística..... | 43 |
| 13. RESULTADOS..... | 47 |
| 14. DISCUSSÃO..... | 60 |
| 15. CONCLUSÕES..... | 71 |
| 16. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 72 |

ÍNDICE DE FIGURAS, QUADROS, TABELAS E GRÁFICOS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1: | Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do Citomegalovírus... | 6 |
| Figura 2: | Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do Herpes Simplex 1. | 10 |
| Figura 3: | Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do Vírus Epstein-Barr | 12 |
| Figura 4: | Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do Adenovírus | 16 |
| Figura 5: | Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do Bocavírus | 19 |
| Figura 6: | Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do Rotavírus | 21 |
| Figura 7: | Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do Norovírus | 24 |
| Figura 8: | Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do Astrovírus | 30 |
| Quadro 1: | Genogrupos e <i>clusters</i> dos Norovírus | 26 |
| Quadro 2: | Relação dos oligonucleotídeos utilizados para todos os vírus pesquisados | 44 |
| Quadro 3: | Ciclo de PCR e <i>Nested-PCR</i> aplicado à cada vírus pesquisado | 46 |
| Tabela 1: | Quadros de imunodeficiências apresentadas pelos pacientes cujas amostras fecais foram analisadas neste estudo | 48 |
| Tabela 2: | Positividade das amostras fecais analisadas para os diferentes vírus pesquisados | 49 |
| Tabela 3: | Resultados da pesquisa viral das amostras fecais, em relação ao tipo de imunodeficiência apresentada pelos pacientes | 53 |
| Tabela 4: | Distribuição da infecção por vírus, parasitas, bactérias e fungos entre as amostras analisadas | 56 |
| Tabela 5: | Casos de co-infecção parasitária e viral | 56 |

| | |
|---|----|
| Tabela 6: Número de óbitos em relação à ocorrência de infecção entérica | 57 |
| Gráfico 1: Representação gráfica dos resultados das amostras fecais positivas quanto a detecção de vírus | 50 |
| Gráfico 2: Distribuição percentual de infecção entérica viral entre os pacientes de acordo com a causa de imunodeficiência | 52 |
| Gráfico 3: Relação entre detecção viral e sexo dos pacientes observada nos diversos quadros de imunodeficiência | 55 |
| Gráfico 4: A relação entre os índices de TCD4 ⁺ /TCD8 ⁺ e a detecção de patógenos entéricos dos pacientes com AIDS | 58 |
| Gráfico 5: Relação entre infecção entérica, índice TCD4 ⁺ /TCD8 ⁺ e número de óbitos | 59 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

AdV: Adenovírus

AstV: Astrovírus

BLAST: Programa de busca de similaridades de seqüências de nucleotídeos disponíveis em bancos de dados.

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

cDNA: Ácido Desoxiribonucleico complementar

CGL: Cistos de *Giardia lamblia*

CMV: Citomegalovírus

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DNA: Ácido Desoxiribonucleico

dNTPs: Dideoxynucleotídeos Trifosfato

EBV: Epstein-Barr vírus

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

EIA: Enzyme Immunoassay

EGTA: Ácido Etilenoglicoltetracetato

EPF: Exame Parasitológico de Fezes

FDA: *Food and Drug Administration*

HBoV: Bocavírus de Humanos

HUCFF: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

HSV: Herpes Simplex Vírus

IF: Imunofluorescência

IgG: Imunoglobulina G

IME: Imunomicroscopia Eletrônica

KCl: Cloreto de Potássio

LAVIREO: Laboratório de Viroses Respiratórias, Entéricas e Oculares

LES: Lupus Eritematoso Sistêmico

LSS: Larvas de *Strongyloides stercoralis*

MAbs: Anticorpos Monoclonais

MgCl: Cloreto de Magnésio

µL: Microlitro

NaOH: Hidróxido de Sódio

NoV: Norovírus

OEV: Ovos de *Enterobius vermicularis*
OOI: Oocisto de *Isospora belli*
ORFs: *Open Reading Frames* – Seqüências de Leitura Aberta
PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PEG: Polietilenoglicol
PTLD: *Posttransplatation Lymphoproliferative Disease*
RNA: Ácido Ribonucléico
RT-PCR: Transcrição Reversa + Reação em Cadeia da Polimerase
RV: Rotavírus
TBE: Tampão tris-ácido Bórico - EDTA
TCPH: Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas
TMO: Transplante de Medula Óssea
TOS: Transplantes de Órgãos Sólidos
Tris-HCl: Tris[hidroximetil]aminometano – Ácido Clorídrico
Tx: Transplante
TxR: Transplante Renal
UV: Ultra-Violeta

1. INTRODUÇÃO

Um indivíduo imunocomprometido é aquele que apresenta algum grau de comprometimento do seu sistema imunológico. Esse indivíduo pode, por exemplo, ser portador de alguma imunodeficiência primária ou ter desenvolvido alguma doença que atue agredindo especificamente o sistema imunológico ou, ainda, que esteja sendo tratado com drogas citotóxicas e/ou imunossupressoras. As doenças decorrentes de imunodeficiências primárias resultam de um defeito em quase todos os estágios da diferenciação no sistema imunológico, e são classificadas em imunodeficiência humoral, imunodeficiência mediada por células, imunodeficiência combinada, e imunodeficiência parcial; estas são doenças hereditárias e raras. As imunodeficiências secundárias são mais comuns, as quais resultam de condições como desnutrição, distúrbios linfoproliferativos, agentes como raios X, infecções virais, medicamentos citotóxicos e corticosteróides (Roitt & Delves, 2004).

Uma grande variedade de protozoários, fungos, bactérias e vírus são classificados como patógenos oportunistas em indivíduos imunocomprometidos, os quais, dependendo da natureza da imunossupressão no momento da infecção, não conseguem naturalmente suplantar a infecção (Hierholzer, 1992; Patel & Paiva, 1997; Pollock & Farthing, 2000; Kishore *et al.*, 2004; Tashiro *et al.*, 2006).

As infecções gastrointestinais desde infecções virais e fúngicas da orofaringe até infecções virais e bacterianas do cólon e ânus são mais comuns e mais graves em indivíduos imunocomprometidos e podem afetar todo o trato

gastrointestinal (Forrest, 2004). As causas de diarreia em indivíduos imunossuprimidos são multifatoriais e incluem o uso de drogas antiretrovirais, imunomoduladores e álcool, além de outras causas não infecciosas, assim como infecções sistêmicas tais como a tuberculose (Thom & Forrest, 2006).

Em pacientes com AIDS [síndrome que pode se desenvolver com a progressão da infecção pelo HIV, onde ocorre destruição progressiva das células de defesa do organismo - principalmente dos linfócitos TCD4⁺, induzindo ao indivíduo ficar mais suscetível às doenças relacionadas à queda de imunidade], múltiplos patógenos podem estar envolvidos na etiologia das infecções gastrointestinais, sendo reconhecida a co-morbidade das infecções por *Cryptosporidium* spp., citomegalovírus e o complexo *Mycobacterium avium* [MAC] (Lewthwaite *et al.*, 2005). As infecções parasitárias são a causa mais freqüente de diarreia em pacientes HIV-positivos, não submetidos à terapia HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*), apresentando sintomas prolongados, perda de peso e baixa contagem de linfócitos TCD4⁺. Por outro lado, a utilização da HAART eleva a contagem de linfócitos TCD4⁺ de pacientes com diarreia crônica, resultando na resolução da diarreia em mais de 85% dos indivíduos afetados. Conseqüentemente, a incidência de diarreia parasitária em indivíduos HIV-positivos tem sido reduzida significativamente nas últimas décadas, em países onde a HAART tem sido amplamente utilizada. Contudo, a despeito dessa redução, existem fatores relacionados aos pacientes HIV-positivos apresentando infecções gastrointestinais, que estão associados com morbidade e mortalidade,

entre esses fatores pode-se destacar: (1) falta de acesso a HAART, (2) tratamento inadequado, e (3) não identificação do surgimento de resistência ao antiviral durante a terapia (Lewthwaite *et al.*, 2005; Thom & Forrest, 2006).

A diarreia é uma das principais causas de morbidade e mortalidade associada a HIV/AIDS em todo o mundo. Em países em desenvolvimento, a diarreia persistente, de duração superior a sete dias, afeta até 95% dos pacientes com AIDS (Thom & Forrest, 2006). A diarreia em indivíduos HIV-positivos pode ser uma consequência da própria infecção pelo HIV, da infecção por diversos vírus, bactérias e parasitos ou consequência da HAART, especialmente com o uso de inibidores de protease (Pierre *et al.*, 2004; Sestak, 2005). As causas mais comuns de diarreia bacteriana em pacientes infectados pelo HIV são *Salmonella*, *Campylobacter* e *Shigella* spp. O complexo *Mycobacterium avium* em pacientes em estágios avançados da AIDS apresenta uma predileção para o trato gastrointestinal, assim como para os tecidos linfóides, e pode se disseminar através do sangue (Thom & Forrest, 2006). As diarreias parasitárias em pacientes HIV-positivos ou com sintomas de AIDS são mais frequentemente causadas por *Cryptosporidium* spp, *Microsporidium* spp., *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Strongyloides stercoralis* e *Isospora belli* (Lewthwaite *et al.*, 2005; Thom & Forrest, 2006).

As desordens gastrointestinais são complicações frequentemente observadas em pacientes transplantados (Helderman, 2001; Helderman & Goral,

2002; Rubin, 2001; Arslan *et al.*, 2007.; Kamboj *et al.*, 2007). A maioria dessas complicações é causada pelo procedimento da terapia imunossupressora, infecções, injúria e ulceração da mucosa, doença do trato biliar, diverticulite, pancreatite e neoplasias. A diarreia que pode ser causada por agentes bacterianos, virais e parasitários, além de por quase todos os agentes imunossupressivos administrados é uma complicação importante em transplantados e pode levar a descontinuação da terapia (Helderman, 2001; Rubin, 2001; Arslan *et al.*, 2007; Kamboj *et al.*, 2007). Após transplante de intestino, 39% dos pacientes apresentam enterites infecciosas (Ziring *et al.*, 2005). A diarreia também é comum em receptores de medula óssea (Kamboj *et al.*, 2007). A diarreia infecciosa pós-transplante tem sido associada mais comumente a patógenos virais, particularmente o citomegalovírus, os vírus herpes simplex e os adenovírus (Helderman & Goral, 2002; Merzeville *et al.*, 2006). Contudo, infecções bacterianas causadas por *Yersinia enterocolitica* e *Clostridium difficile* e infecções parasitárias causadas por *Strongyloides stercoralis* também são descritas nesses pacientes (Helderman & Goral, 2002).

A principal causa de gastroenterite viral em pacientes HIV-positivos é a infecção pelo citomegalovírus, embora com a introdução da HAART a incidência dessa infecção nessa população tenha sido reduzida (Lewthwaite *et al.*, 2005; Thom & Forrest, 2006). O citomegalovírus é também a causa mais comum de gastroenterite viral em transplantados, embora vários outros patógenos virais tenham sido encontrados causando esse quadro (Hebart & Einsele, 2004; Gisburg & Thuluvath, 2005). Vírus ditos entéricos tais como os adenovírus e os calicivírus

são reconhecidos como agentes de doença gastrointestinal pós-transplante (Gallimore *et al.*, 2004; Mattner *et al.*, 2006; Merzeville *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008). Além disso, outros vírus como rotavírus, astrovírus, vírus herpes simplex e vírus Epstein-Barr, também devem ser considerados como possíveis agentes de doença gastrointestinal em pacientes imunocomprometidos (Peigue & Lafeuille, 1991; Stewart *et al.*, 1995; Sabin *et al.*, 1999; Helderman & Goral, 2002; Gallimore *et al.*, 2005; Stelzmuller *et al.*, 2005; Dray *et al.*, 2006; Tashiro *et al.*, 2006; Yee *et al.*, 2006; Stelzmuller *et al.*, 2007; Rossite *et al.*, 2007).

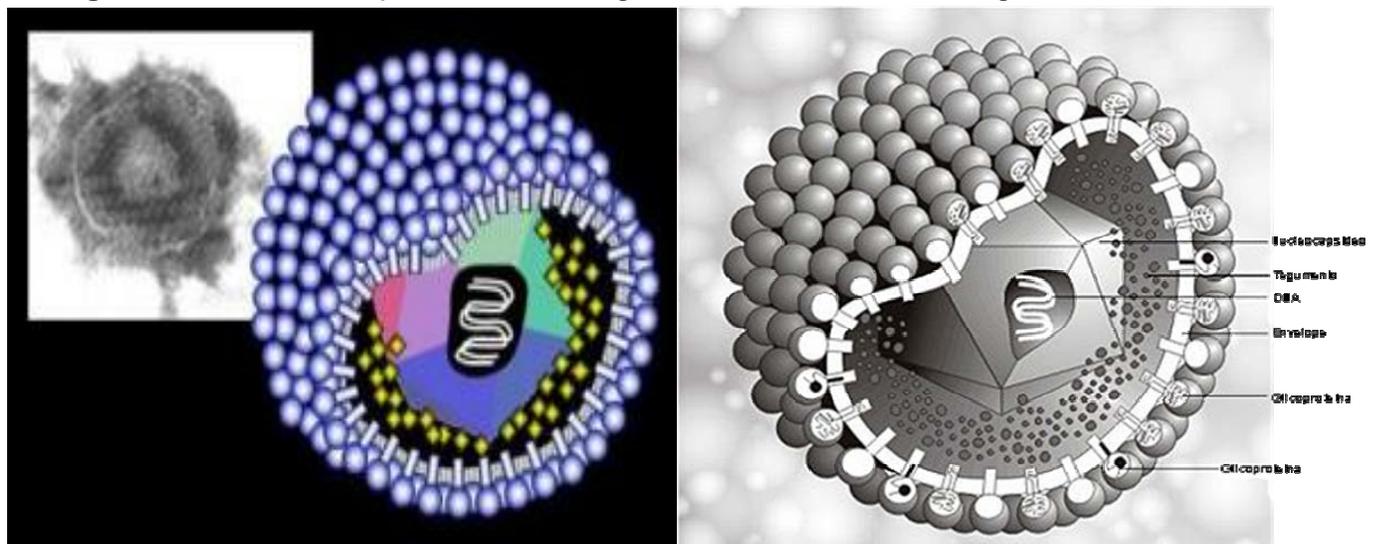
2.0. Citomegalovírus (CMV)

O citomegalovirus humano é um membro da ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, sub-família *Betaherpesvirinae*, gênero *Citomegalovirus*, espécie *Herpesvirus Humano 5* (Mocarski, Shenk & Pass, 2007). A partícula viral apresenta diâmetro aproximado de 200 a 300 nm, possui envelope lipoprotéico, com espículas virais ou glicoproteínas, projetadas para fora de sua estrutura, envolvendo um capsídeo de simetria icosaédrica. Este capsídeo contém o genoma de DNA de fita dupla não segmentado, de aproximadamente 196-241 Kpb, com a capacidade de codificar 166 produtos gênicos [Figura 1] (Mocarski, Shenk & Pass, 2007).

Semelhante aos outros herpesvírus, a infecção natural por CMV é caracterizada por uma infecção primária, seguida de latência a partir da qual o vírus pode ser reativado (Mocarski, Shenk & Pass, 2007). Em geral, a infecção em

indivíduos imunocompetentes é silenciosa, embora possa causar um quadro febril semelhante à mononucleose, e raramente está associada com complicações (Heininger *et al.*, 2000; Maiorana *et al.*, 2003). Por outro lado, a infecção congênita pode ser grave e induzir seqüelas permanentes no feto (Mocarski, Shenk & Pass, 2007). Em pacientes imunocomprometidos, o CMV é um dos patógenos oportunistas mais freqüentes, podendo causar doença disseminada grave e letal, resultante da infecção primária, da reinfecção, ou reativação da infecção latente. Complicações comumente associadas à infecção por CMV em pacientes imunocomprometidos incluem pneumonia, enterite, encefalite, hepatite, retinite, colangite, cistite, nefrite, sinusite e supressão medular (Patel & Paiva, 1997; Hebart & Einsele, 2004; Mocarski, Shenk & Pass, 2007).

Figura 1. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do Citomegalovírus.



(Fontes: www.biografix.de/biografix/english/images/2/p_2b2a.jpg,

www.micro.biol.ethz.ch/research/oxenius/projects/p3-1.jpg/hires_image, acesso 24/04/2008).

2.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de CMV em Imunocomprometidos

A infecção por CMV ocorre na maioria dos receptores de transplantes de órgão sólidos [TOS], primariamente nos três meses pós-transplante, quando a imunossupressão é mais intensa. A incidência da doença por CMV é de aproximadamente 25% após transplante de rim, coração, e fígado, mas pode chegar a 50% após transplante de pâncreas ou fígado-pâncreas, sendo até mais elevada após transplantes de coração-pulmão (Patel & Paiva, 1997; Rowshani *et al.*, 2005). A infecção por CMV tem sido associada ao desenvolvimento de rejeição aguda ou crônica do transplante e com a diminuição da sobrevivência do paciente transplantado (Koskinen *et al.*, 1993; Cainelli & Vento, 2002).

A infecção por CMV em pacientes submetidos a TOS apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, desde infecções assintomáticas a doença grave e letal. O CMV pode afetar vários segmentos do trato intestinal, incluindo o esôfago, estômago e intestinos. Os sintomas incluem disfagia, náuseas, vômitos, digestão lenta, dor abdominal, hemorragia gástrica e diarreia (Patel & Paiva, 1997; Ginsburg & Thuluvath, 2005).

Infecções por CMV ainda permanecem como a principal causa de morbidade e mortalidade após transplante de células progenitoras hematopoiéticas [TPCH], também denominado transplante de medula óssea [TMO]. Historicamente, infecções por CMV não tratadas eram associadas a aproximadamente 25% de mortalidade em pacientes submetidos à TCPH. A

despeito da introdução, nas duas últimas décadas, de medidas terapêuticas efetivas, a mortalidade por doença causada por CMV, ainda, é uma ameaça, a longo prazo ao sucesso do TCPH. As manifestações clínicas mais comuns são pneumonia, hepatite e doença gastrointestinal, que pode envolver desde o esôfago até o cólon (Boeckh *et al*, 2003; Herbart & Einsele, 2004).

Antes da implementação da HAART, o CMV era uma das causas mais importantes de infecção oportunistas em pacientes HIV-positivos. Aproximadamente 40% dos pacientes HIV-positivos com doença avançada apresentavam uma ou mais manifestações de doenças causadas por CMV, ao longo da vida. O prognóstico era geralmente ruim a despeito da disponibilidade de drogas antivirais e da baixa prevalência de cepas virais resistentes. A sobrevivência após o diagnóstico, era de 4 a 9 meses (revisado por Steininger, Puchhammer-Stöck, & Popow-Kraupp, 2006). A morbidade e a mortalidade da doença entre esses pacientes foi, dramaticamente, alterada com a ampla implementação da HAART. Infecções oportunistas, incluindo a infecção intestinal por CMV diminuíram drasticamente, coincidindo com um aumento da sobrevida dos pacientes (Pollok & Farthing, 2000; Steininger, Puchhammer-Stöck, & Popow-Kraupp, 2006). Antes da introdução da HAART, 5 a 15% dos pacientes HIV-positivos apresentavam infecção do esôfago, estômago, intestino delgado ou cólon (Pollok & Farthing, 2000). Embora o CMV possa infectar qualquer parte do trato gastrointestinal, o sítio mais comum da infecção é o cólon, e a manifestação mais comum da colite por CMV é a diarreia crônica ou intermitente em associação com dor abdominal. A doença também é associada com sangramento retal brando

ou grave ou dor abdominal na ausência de diarreia e, além disso, a febre é freqüente. A dor pode preceder o desenvolvimento de megacólon tóxico, e a perfuração intestinal é rara, mas pode ser letal. A infecção colônica por CMV pode ocorrer em associação com infecção em outras partes do trato gastrointestinal, incluindo o esôfago, a qual geralmente resulta em disfagia e odinofagia, e a árvore biliar-pancreática, a qual resulta da colangiopatia ou pancreatite relacionada a AIDS, e se manifesta como dor no abdômem superior (Pollock & Farthing, 2000).

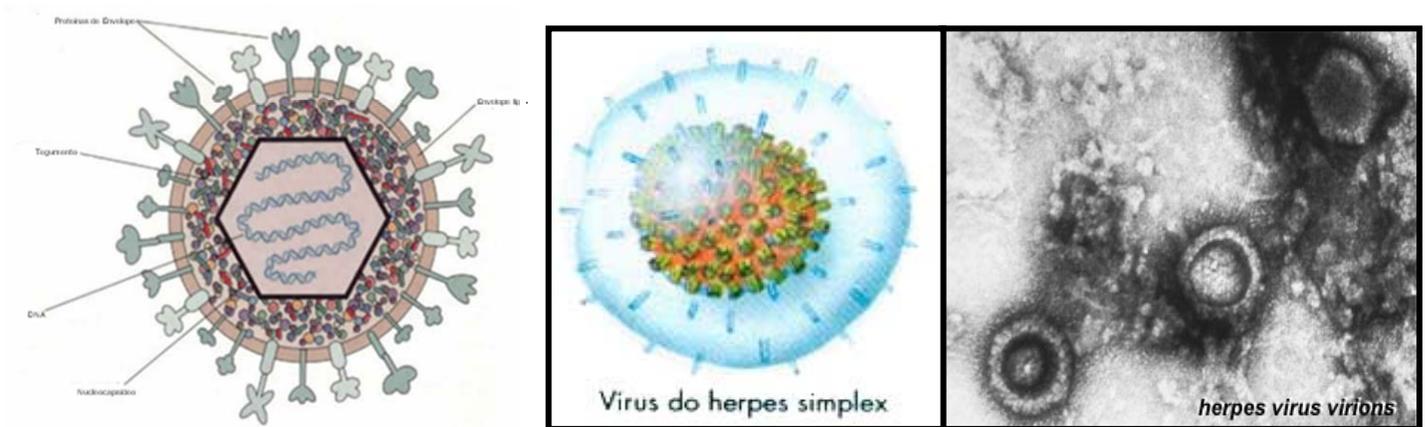
3.0. Vírus Herpes simplex tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2)

Os HSVs pertencem a ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Simplexvirus*, espécies *Herpesvirus Humano 1* e *Herpesvirus Humano 2*. Esses vírus possuem características morfológicas e ciclo replicativo semelhante aos de outros membros da família *Herpesviridae*, causando infecção latente e/ou persistente nas células do hospedeiro. São constituídos por um core eletrodenso, composto por DNA de fita dupla linear de 150-153 kpb. O capsídeo é icosaédrico e apresentam uma camada de proteínas amorfas, denominada tegumento e um envelope lipídico composto de glicoproteínas e poliaminas inseridas em sua superfície [Figura 2] (Roizman, Knipe & Whitley, 2007).

Todos os herpesvírus possuem a habilidade de estabelecer infecção latente no hospedeiro. Durante a latência o genoma viral está presente em vários tecidos, mas as partículas virais não são produzidas. A reativação pode resultar em doença clinicamente aparente ou excreção assintomática do vírus. Em humanos,

já foram identificados múltiplos fatores de risco para a reativação dos HSVs incluindo trauma físico, manipulação cirúrgica da raiz do gânglio trigeminal e doença grave com incubação prolongada (revisado por Miller & Dummer, 2007).

Figura 2. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do vírus Herpes Simplex tipo 1.



(Fontes: www.bact.wisc.edu/themicrobiolword/hsv1struc.jpg,
www.universitario.com.br/.../imagens/virus_herpes_simplex_01.jpg,
<http://embryology.med.unsw.edu.au/.../CDCherpes.jpg>, acesso 24/04/2008).

As características clínicas das infecções por HSV são variáveis podendo ser assintomáticas. A gengivoestomatite é uma apresentação primária comum em crianças. Adultos podem apresentar uma síndrome semelhante à mononucleose, associada com faringite. A manifestação orolabial aparece mais comumente na borda dos lábios. O eczema herpético é caracterizado por pústulas e bolhas na pele, geralmente na presença de atopia. A infecção primária genital é caracterizada por dor intensa, vaginite erosiva, vulvite ou balanite. Manifestações

neurológicas também podem ocorrer, particularmente, meningite asséptica (revisado por Swearingen & Ailor, 2007).

3.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de HSV em Imunocomprometidos

Os herpesvírus estão entre os agentes oportunistas que podem estabelecer, no paciente imunodeprimido, infecções de difícil tratamento com tendência a maiores períodos de duração, podendo gerar complicações nesses indivíduos já debilitados e algumas vezes evoluindo até a morte (Hierholzer, 1992, Patel & Paiva, 1997; Amenábar *et al.*, 2006; Miller & Dummer, 2007). A doença nesses pacientes pode ser decorrente da infecção primária ou reativação. Em pacientes transplantados, a reativação do HSV resulta em lesões mucocutâneas orais ou genitais, em geral durante o primeiro mês pós-transplante, em cerca de um terço dos adultos transplantados e 8% dos pacientes pediátricos. Tanto a reativação quanto a infecção primária podem ocasionalmente resultar em pneumonite, encefalite, traqueobronquite, esofagite, hepatite, ou doença visceral disseminada (Patel & Paiva, 1997; Amenábar *et al.*, 2006; Miller & Dummer, 2007). Embora a infecção do trato gastrointestinal não seja descrita com freqüência, casos de colite e jejunita ulcerativa já foram observados em pacientes imunossuprimidos (Wasselle *et al.*, 1992; Kingreen *et al.*, 1997; Dray *et al.*, 2006).

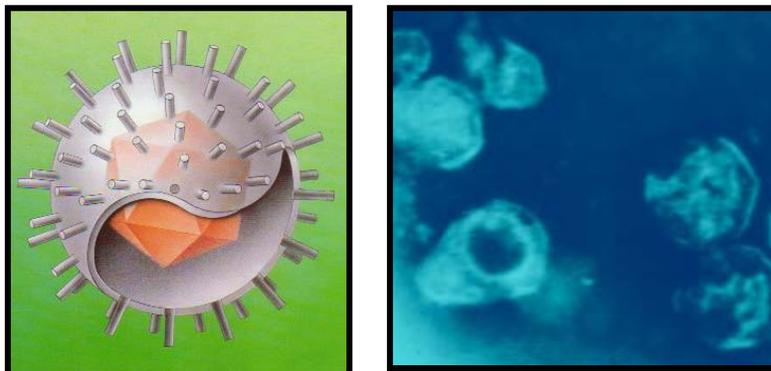
Herpes simples visceral e encefalite herpética são mais comuns nos pacientes com AIDS gravemente imunodeprimidos. Os órgãos mais acometidos são o pulmão, esôfago, fígado e as glândulas suprenais. O trato gastrointestinal

é, todavia, de importância fundamental, devido a sua extensão e a dificuldade no diagnóstico diferencial com outras infecções oportunistas, tais como CMV e o sarcoma de Kaposi (Stewart *et al.*, 1995). A infecção dos HSVs no trato intestinal de pacientes HIV-positivos geralmente se apresenta associada à dor abdominal, tenesmo e diarreia, com ou sem presença de sangue (Chui & Owen, 1994).

4.0. Vírus Epstein-Barr (EBV)

O EBV está classificado na ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Gamaherpesvirinae*, gênero *Lymphocryptovirus*, espécie *Herpesvirus Humano 4*. A partícula viral consiste em um core contendo o genoma de DNA fita dupla linear que codifica aproximadamente 100 proteínas. Esse core é circundado por um capsídeo icosaédrico, um tegumento composto de proteínas circundando o capsídeo e um envelope, contendo espículas glicoprotéicas [Figura 3] (Kieff & Rickinson, 2007).

Figura 3. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do vírus Epstein-Barr.



(Fontes: www.iwdl.net/images%20tests/ebv.JPG;

cbr.med.harvard.edu/images/story/ebv.jpg, acesso 24/04/2008).

O EBV é amplamente distribuído na natureza, estimando-se que cerca de 80% dos adultos de todo o mundo já tenham sido infectados por ele. O EBV se dissemina por contato íntimo entre as pessoas susceptíveis e portadores assintomáticos (Cohen, 2000).

O EBV estabelece infecção persistente e está associado com várias doenças, como a mononucleose infecciosa, linfomas, carcinoma de nasofaringe e leucoplasia pilosa, afetando principalmente pacientes imunossuprimidos (Cohen, 2000). Já foi detectado em fluido cérebro espinhal em pacientes HIV-positivos que desenvolveram linfoma cerebral primário, porém seu papel neste tumor ainda é incerto (Wang *et al.*, 2007).

4.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de EBV em Imunocomprometidos

A infecção por EBV em pacientes transplantados pode causar sintomas brandos como mal-estar, febre, dor de cabeça, e dor de garganta, mas também pode estar associada com a doença linfoproliferativa pós-transplante [*Posttransplantation lymphoproliferative disease* – PTLN], a qual é uma causa significativa de morbidade e mortalidade em pacientes transplantados (Patel & Paiva, 1997; Ponticelli & Paccerini, 2005; Cohen *et al.*, 2007; Ljungman, 2007). A apresentação clínica é bastante variada e inclui síndrome mononucleose-*like*, adenopatia, tonsilite e dor de garganta, dor abdominal, anorexia, icterícia, perfuração intestinal, sangramento gastrointestinal, disfunção renal, disfunção

hepática, pneumotórax, infiltrado pulmonar e perda de peso (Patel & Paiva, 1997). A maioria das PTLDs está associada ao EBV (Patel, & Paiva, 1997; Ponticelli & Passerini, 2005; Cohen *et al.*, 2007; Ljungman, 2007). A PTLD pode afetar o trato gastrointestinal em cerca de 10% dos pacientes transplantados. A doença é geralmente precedida de hemorragia ou abdomen agudo, devido à perfuração ou obstrução (Helderman & Goral, 2002). Enterite por EBV já foi descrita em paciente receptor de TCPH (Tashiro *et al.*, 2006).

Este vírus está associado também com desordens linfoproliferativas em pacientes com imunodeficiência congênita ou adquirida, como pacientes transplantados e HIV-positivos (Cohen, 2000; Serraino *et al.*, 2005; Tashiro *et al.*, 2006). Esses pacientes possuem imunidade mediada por células T deficientes e são incapazes de controlar a proliferação de células B infectadas pelo EBV. Esses indivíduos podem apresentar sintomas de mononucleose infecciosa ou febre de linfoproliferação localizada ou disseminada, envolvendo linfonodos, fígado, pulmão, rins, medula óssea, SNC ou intestino delgado (Beaulieu & Sullivan, 1997; Cohen, 2000).

5.0. Adenovírus (AdV)

A família *Adenoviridae* é subdividida em quatro gêneros: *Aviadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Atadenovirus* e *Siadenovirus* (Davison, Benkö & Harrach, 2003). Os AdV responsáveis por infecções em humanos estão classificados no gênero *Mastadenovirus*. Os AdV de humanos compõem um grande grupo constituído de 51 sorotipos, divididos em seis espécies [anteriormente designadas como gêneros

ou subgêneros] classificadas como *Adenovirus Humano A – F*, de acordo com suas propriedades físico-químicas, imunológicas e bioquímicas (Wold & Horwitz, 2007).

As partículas virais são icosaédricas, medindo 70 a 100 nm de diâmetro. O vírion consiste de um capsídeo protéico envolvendo um core, que contém o DNA viral. O capsídeo é composto de 252 capsômeros, sendo 240 hexons [como faces do icosaedro] e 12 pentons. Cada penton contém uma base, que faz parte da superfície do capsídeo e uma projeção em forma de fibra, cujo tamanho varia entre os diferentes sorotipos [Figura 4]. Seu genoma é composto por uma molécula de DNA de fita dupla, linear e não segmentado, com aproximadamente 35 Kpb de tamanho (Wold & Horwitz, 2007).

Os AdV são patógenos pediátricos comuns associados a infecções respiratórias, gastrointestinais e oculares. Contudo, entre pacientes imunocomprometidos, os AdV podem causar infecções persistentes e doença disseminada com elevada morbidade e mortalidade (Hierholzer, 1992; Munoz, Piedra & Demmier, 1998; Baldwin *et al.*, 2000; La Rosa *et al.*, 2001; Leen & Rooney, 2004).

receptores de fígado, sendo a manifestação clínica mais comum a hepatite. Entre os pacientes adultos receptores de TOS a viremia por AdV ocorre em cerca de 8,3% em transplantes hepáticos, 6,5% em transplantes renais, e 6,5% em transplantes cardíacos (Humar *et al.*, 2005). Transplantados renais freqüentemente apresentam cistite hemorrágica e nefrite. Em transplantados cardíacos, a infecção por AdV tem sido associada com rejeição do enxerto e vasculopatia arterial coronariana (Shirali *et al.*, 2001; Kajaoghlamian, Flomberg & Horwitz, 2003). Em transplante de pulmão, tem sido descrita rejeição do enxerto (Bridges *et al.*, 1998).

Em pacientes submetidos à TCPH, a doença pode se desenvolver em diversos órgãos podendo ocorrer cistite hemorrágica, gastroenterite, pneumonia, hepatite, nefrite, conjuntivite, púrpura trombocitopênica trombótica e pancreatite (Howard *et al.*, 1999; Baldwin *et al.*, 2000; Kajaoghlamian, Flomberg & Horwitz, 2003; Mezerville *et al.*, 2006). A doença causada por AdV apresenta mortalidade significativa entre pacientes receptores de TCPH, com índices de até 76% em casos de doença disseminada (Hale, *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 1999; Ison, 2006; Merzeville *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008). Nesses pacientes a doença pode ser localizada ou disseminada (Howard *et al.*, 1999; La Rosa *et al.*, 2001; Kajaoghlamian, Flomberg & Horwitz, 2003).

Em pacientes com AIDS ocorrem pneumonia, meningoencefalite, e hepatites associadas aos AdV, algumas vezes como infecções generalizadas, com um curso rápido e fatal. Em outros pacientes, gastroenterite ou colite são as

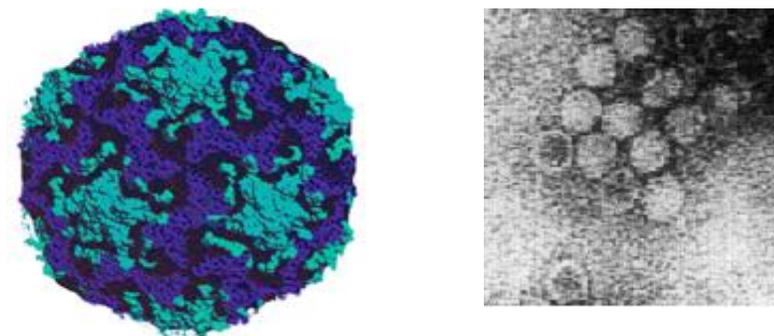
principais apresentações clínicas (Hierholzer, 1992; Yan *et al.*, 1998; Thomas, Pollok & Gazzard, 1999; Trevino *et al.*, 2001). A excreção gastrointestinal do vírus em estágios tardios da AIDS tem sido associada com um prognóstico ruim (Sabin *et al.*, 1999).

6.0. Bocavírus de Humanos (HBoV)

O HBoV foi descrito pela primeira vez em 2005, em associação com quadro de infecção respiratória (Allander *et al.*, 2005) e foi classificado como um membro da família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, gênero *Bocavirus*, espécie *Bocavirus Humano*. Como todos os membros dessa família, possui um genoma constituído de DNA de fita simples que codifica para, pelo menos, duas proteínas estruturais (VP1 e VP2) e uma não estrutural (NS1). O genoma do HBoV codifica, ainda, uma proteína denominada NP, cuja função ainda é desconhecida (Allander *et al.*, 2005). Esse genoma fica protegido por um capsídeo icosaédrico [Figura 5].

O nome bocavírus é derivado da combinação “bo” (de bovino) e “ca” (de canino), ambos membros do gênero bocavírus juntamente com o bocavírus humano. O bocavírus de bovinos (parvovírus de bovinos) causa diarreia primariamente. Já o bocavírus de caninos é implicado como causa de doença respiratória neonatal e embriopatia (McIntosh, 2006).

Figura 5. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica dos Parvovírus.



(Fontes:

http://personal.fimnet.fi/laaketiede/hanski.tapiovaara/ers_2006_tiedostot/image022.jpg, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WIntkey/Images/em_parvo_2.jpg, acesso 24/04/2008).

A infecção por HBoV parece ser bastante comum na população. Pelo fato da primeira detecção deste agente ter ocorrido em amostras provenientes do trato respiratório, foi sugerido que o HBoV seria um agente etiológico de doença respiratória. De fato, esse vírus tem sido identificado em amostras respiratórias, principalmente em crianças, com doença do trato respiratório superior e inferior em diversos países, com índices de prevalência entre 1,5 a 19% (revisado por Allander, 2008). Esse vírus também já foi detectado no sangue de pacientes com doença respiratória (Fry *et al.*, 2007; Allander *et al.*, 2007). Contudo, estudos têm reportado sintomas diarreicos em crianças com infecção respiratória por HBoV (Arnold *et al.*, 2006; Kesebir *et al.*, 2006), assim como a detecção de HBoV em fezes de crianças com infecções respiratórias (Neske *et al.*, 2007). Mais ainda, estudos recentes demonstraram a presença do HBoV em fezes de crianças com

diarréia aguda (Albuquerque *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2007; Vicente *et al.*, 2007), sugerindo que o HBoV poderia ser um patógeno respiratório e entérico, semelhante a outros membros do gênero bocavírus.

6.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de HBoV em Imunocomprometidos

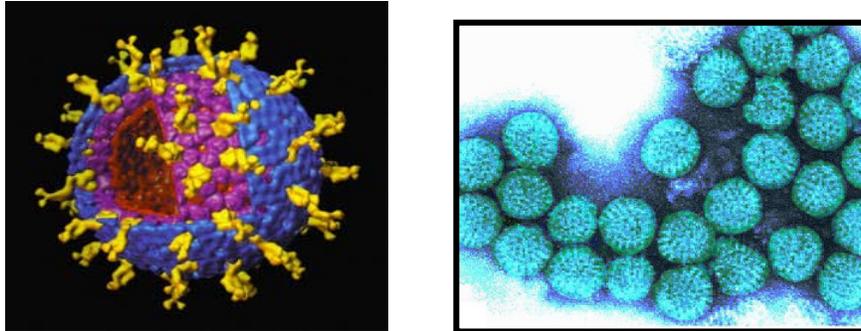
Com relação a infecções por HBoV em pacientes imunodeficientes, esse patógeno já foi detectado em pacientes HIV-positivos, pacientes transplantados e pacientes portadores de leucemia com quadros de doença respiratória (Kim, Boeckh & Englund, 2007; Koskenvuo *et al.*, 2007; Garbino *et al.*, 2008). Contudo, até o momento, ainda não existe nenhum relato de detecção de HBoV nas fezes de pacientes imunocomprometidos como único patógeno causando quadros de gastroenterite.

7.0. Rotavírus (RV)

Os rotavírus são classificados na família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, espécie *Rotavirus*. A partícula viral mede aproximadamente 75nm de diâmetro e não possui envelope, apresentando capsídeo duplo de simetria icosaédrica e possuem todas as enzimas necessárias à síntese do RNA mensageiro. O genoma consiste de 11 segmentos de RNA de fita dupla [RNA f.d.], não infeccioso, cada segmento codificando, em geral, uma única proteína. O vírion, quando observado

por microscopia eletrônica, apresenta três camadas protéicas distintas [Figura 6] (Estes & Kapikian, 2007).

Figura 6. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do Rotavírus.



(Fontes: http://pix.elnuevodiario.com.ni/2006/04/250x250_1146242618_Roavirus.jpg, <http://i.esmas.com/image/.../rotavirusNtnueva.jpg>, acesso 24/04/2008).

De acordo com as características sorológicas, os RV são classificados em grupo e subgrupo. A classificação em grupo é determinada pela proteína VP6, codificada pelo sexto segmento genômico, que constitui o capsídeo interno e pode ser realizada através de testes sorológicos (ensaio imunoenzimático – EIA), moleculares (seqüenciamento), ou presumida a partir do perfil de migração em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Sete grupos (A - G) são reconhecidos e encontrados em animais, enquanto que somente os grupos A, B e C são descritos em humanos (Estes & Kapikian, 2007). Os RV do grupo A são os mais comuns na natureza. Os RV dos grupos B e C são também descritos causando infecções em humanos, contudo são encontrados em menor frequência (Estes & Kapikian, 2007).

Os RV são a causa mais comum de diarreia aguda em crianças imunocompetentes, abaixo de cinco anos de idade. As enterites por RV induzem à doença grave, que frequentemente requer hospitalização. Estima-se que os RV sejam responsáveis por 39% das hospitalizações infantis devido à diarreia [variando de 29% a 45% dependendo da localidade] (Parashar *et al.*, 2006).

A infecção por RV se manifesta na forma de diarreia aguda. O problema é mais grave quando ocorre desidratação grave e falta de tratamento adequado, podendo levar à morte (Estes & Kapikian, 2007).

Em adultos, as infecções por RV são menos frequentes e, em geral, causam uma enterite autolimitada (Anderson & Weber, 2004; Feeney *et al.*, 2006).

7.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de RV em Imunocomprometidos

Em pacientes imunocomprometidos, são descritos sintomas gastrointestinais graves associados aos RV, em crianças e adultos (Saulsbury, Winkkelstein & Yolken, 1980; Wood *et al.*, 1988), incluindo pacientes com imunodeficiências primárias, pacientes submetidos à TOS ou TCPH (Losonsky *et al.*, 1985; Fitts, *et al.*, 1995; Peigue-Lafeuille *et al.*, 1991; Thomas, Pollok, & Gazzard, 1999; Kang *et al.*, 2002; Liakopoulou *et al.*, 2005; Stelzmueller *et al.*, 2005; Ginsburg & Thuluvath, 2005; Yee *et al.*, 2006; Stelzmueller *et al.*, 2007) e pacientes HIV-positivos (Gilger *et al.*, 1992; Mura *et al.*, 1996; Thomas, Pollok, & Gazzard, 1999; Liste *et al.*, 2000).

Os dados publicados, até o momento, demonstram que os RV do grupo A, são responsáveis por 92% das infecções por este agente entre humanos (revisado por Santos & Hoshino, 2005). Contudo, com o desenvolvimento e aplicação de métodos de diagnóstico molecular para detecção de RV dos grupos B e C, a frequência de relatos de infecções por esses agentes vem aumentando (Bányai *et al.*, 2006; Barman *et al.*, 2006; Iizuka *et al.*, 2006; Steyer *et al.*, 2006; Abid *et al.*, 2007), já tendo sido descrita infecção por RV do grupo C em paciente submetido a transplante renal (Yee *et al.*, 2006).

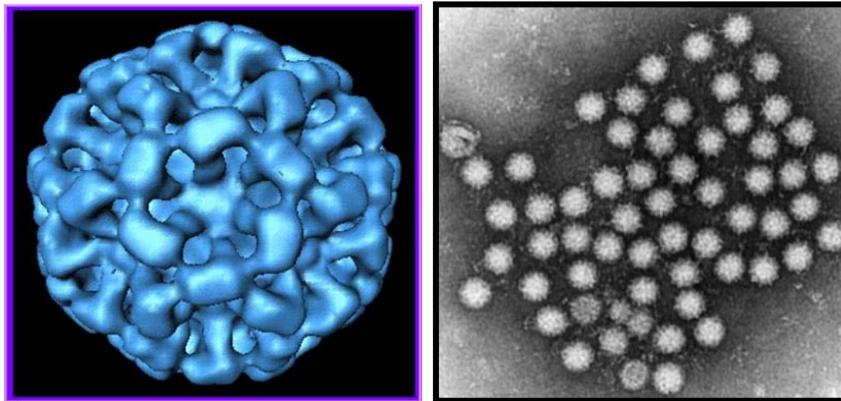
8.0. Norovírus (NoV)

Os dois principais grupos de calicivírus humanos estão classificados em gêneros distintos da família *Caliciviridae*. A nomenclatura provisória *Norwalk-like virus* e *Sapporo-like virus* foi alterada para *Norovirus* e *Sapovirus*, respectivamente (CDC, 2002; CDC, 2003; Lopman *et al.*, 2003). Embora todos os calicivírus compartilhem de um mesmo ancestral comum os *Norovirus* e *Sapovirus* formam dois grupos genéticos distintos, dentro da mesma família.

As partículas dos NoV, (espécie *Norwalk virus*) apresentam cerca de 26-37 nm de diâmetro, não contêm envelope lipídico, apresentando capsídeo de simetria icosaédrica e material genético composto por uma molécula de RNA fita simples de polaridade positiva poliadenilada, com aproximadamente 7,6 Kpb [Figura 7]. (Atmar & Estes, 2001; Bull *et al.*, 2005).

Os NoV são geneticamente e antígenicamente muito diversos. Historicamente, a classificação dos norovírus era feita com base em estudos em voluntários e análises por imunomicroscopia eletrônica (IEM). Esses esquemas de classificação antigênica eram de baixa reprodutibilidade, devido a reações cruzadas dos anticorpos. Como não é possível ser feita a sorotipagem por teste de neutralização, pela falta de um sistema hospedeiro para propagar os NoV, as técnicas de RT-PCR e seqüenciamento se tornaram as principais ferramentas para a caracterização desses vírus e para o entendimento da relação entre as diferentes cepas (Ando, Noel & Fankhauser, 2000; Zheng *et al.*, 2006).

Figura 7. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do Norovírus.



(Fontes: <http://www.sph.emory.edu/moelab/projects-Assay.htm>, www.ifremer.fr/envilit/documentation/dossiers/microbio/photos/images/sourcecalicicem.jpg, acesso 24/04/2008).

Até o momento, o Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - ICTV) ainda não estabeleceu

um sistema de classificação para os NoV. Alguns esquemas têm sido propostos, mas ainda não há um consenso entre as regiões a serem analisadas (Katayama *et al.*, 2002; Kageyama *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2006).

Com base na análise de seqüências completas do gene do capsídeo, os NoV foram classificados em cinco genogrupos (GI a GV). Cepas de três genogrupos (GI, GII e GIV) são encontradas em humanos e uma cepa de GII é encontrada em porcos. NoV do genogrupo GIII são encontradas em bovinos e NoV do genogrupo GV em murinos (Karst *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2006). Para evitar confusão e estabelecer critérios claros para a classificação dos NoV, Zheng e colaboradores analisaram 164 seqüências de aminoácidos completas da proteína do capsídeo, incluindo todas as seqüências dos cinco genogrupos disponíveis, na ocasião do estudo, e propuseram um esquema que classifica os NoV em cinco genogrupos e vinte e nove *clusters* genéticos: 8 pertencem ao genogrupo GI, 17 ao GII, 2 ao GIII, 1 ao GIV e 1 ao GV [Quadro 1]. Cada genogrupo é formado por *clusters* e cada *cluster* é formado por cepas com elevada identidade entre suas seqüências. Cepas com seqüências de aminoácidos da ORF2 completa com divergência inferior a 43,8% pertencem ao mesmo *cluster* e as seqüências pertencentes a *clusters* distintos apresentam divergência superior a 45% (Zheng *et al.*, 2006).

Quadro 1. Genogrupos e *clusters* dos Norovírus.

| Genogrupo | Hospedeiro | No. de seqüências analisadas | Clusters |
|------------------|-------------------|-------------------------------------|-----------------|
| GI | Humano | 30 | 8 |
| GII | Humano/Porcino | 121 | 17 |
| GIII | Bovino | 9 | 2 |
| GIV | Humano | 3 | 1 |
| GV | Murino | 1 | 1 |
| Total | | 164 | 29 |

Adaptado de Zheng *et al.*, 2006.

Os NoV podem causar infecção em todos os grupos etários e são os principais agentes virais de surtos de gastroenterites que ocorrem em escolas, cruzeiros, enfermarias militares, creches e comunidades em geral. Normalmente, eles estão associados a surtos originados pela ingestão de água ou alimentos contaminados (Matson *et al.*, 2000; Atmar & Estes, 2002; CDC, 2002; CDC, 2003).

A manifestação da infecção em pacientes imunocompetentes se caracteriza por vômito e diarreia proeminentes que raramente duram mais de três dias. Nestes casos, a reposição endovenosa de flúidos raramente se faz necessária e a excreção do vírus não ultrapassa o período de duas semanas (Green, 2007).

8.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de NoV em Imunocomprometidos

Existem poucos estudos avaliando a infecção por NoV em pacientes imunocomprometidos. Nesses pacientes a doença apresenta um grau mais elevado de gravidade e excreção prolongada do vírus (Gallimore *et al.*, 2004, Morotti *et al.*, 2004; Kaufman *et al.*, 2003 e 2005; Mattner *et al.*, 2006).

A infecção já foi descrita em uma criança com deficiência da imunidade celular, apresentando hipoplasia cartilagem-cabelo [*Cartilage Hair Hypoplasia – CHH*] (Gallimore *et al.*, 2004). O paciente apresentava diarreia crônica e a excreção do vírus foi detectada por um período de 156 dias, durante os quais os sintomas estavam presentes.

No caso de pacientes transplantados, já foram descritos casos de infecção por esse agente em indivíduos submetidos a transplante de rim e de intestino (Morotti *et al.*, 2004; Kaufman *et al.*, 2003 e 2005; Mattner *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008). Num estudo com pacientes que receberam transplante de intestino, foi observado que a enterite acometeu principalmente pacientes jovens, e resultou num quadro de diarreia grave, requerendo entre 9 e 80 dias de reidratação endovenosa, em alguns casos por um período mais prolongado, além de excreção prolongada do vírus (Kaufman *et al.*, 2003 e 2005). A biópsia de pacientes pediátricos submetidos a transplante de intestino, apresentando diarreia prolongada por NoV, demonstrou aumento de infiltrado mononuclear na lâmina própria e nas bordas das vilosidades, desordem das células da superfície do epitélio e aumento da

apoptose nessas células e na lâmina própria (Morotti *et al.*, 2004). Aparentemente, a diferenciação histopatológica entre a enterite por NoV e rejeição do enxerto é difícil uma vez que as duas desordens estão associadas ao aumento da apoptose e inflamação (Morotti *et al.*, 2004; Kaufman *et al.*, 2003 e 2005). Nesses casos, a intensificação da terapia imunossupressora, devido a suspeita de rejeição, parece prolongar os sintomas (Kaufman *et al.*, 2005). Em transplantados renais foram observados sintomas clínicos graves, como falência renal aguda, arritmia e sinais de rejeição de órgão (Mattner *et al.*, 2006).

Infecções entéricas causadas por NoV já foram descritas em pacientes HIV-positivos (Grohmann *et al.*, 1993; Giordano *et al.*, 1999; Thomas, Pollok & Gazzard, 1999), contudo as características dessa infecção ainda não estão claramente descritas.

9.0. Astrovírus (AstV)

Os astrovírus de humanos e animais estão classificados no gênero *Astrovirus*, pertencente à família *Astroviridae*, espécie *Astrovirus Humano*. Os AstV humanos estão classificados em oito tipos antigênicos, baseando-se em técnicas de imunomicroscopia eletrônica e imunofluorescência [IF] com uso de anticorpos policlonais e monoclonais contra vírus isolados em cultura (Méndez & Arias, 2007). Análises genéticas da poliproteína estrutural, que dá origem às proteínas do capsídeo, demonstraram que as cepas de AstV isolados de humanos poderiam ser classificadas também em oito genótipos, que estão correlacionados com os oito

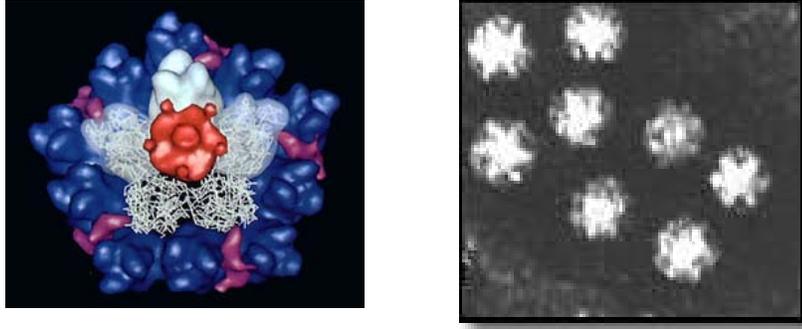
sorotipos conhecidos (HAstV1 - HAstV8) (Belliot, Laveran & Monroe, 1997; Mitchell, 2002).

As partículas de simetria icosaédrica e não envelopadas são pequenas, medem cerca de 28-30 nm de diâmetro. A morfologia em estrela de cinco ou seis pontas, quando presente, é uma importante característica para distinguir os AstV de outras espécies virais, cujas partículas também medem cerca de 30 nm de diâmetro. Embora essa morfologia seja uma característica importante dos AstV, estudos mostram que essa morfologia é encontrada em apenas 10% das partículas de uma preparação para ME (Matsui, 2002) [Figura 8].

O material genético dos AstV é composto por uma molécula de RNA fita simples, poliadenilada, com aproximadamente 6,8 Kb de tamanho. O seu genoma é composto por três *open reading frames* (ORFs), denominadas ORF1a, ORF1b e ORF2. As ORFs 1a (~ 2.700nt) e 1b (~1.550nt) codificam proteínas não estruturais, como a serina protease 3C-like e RNA polimerase RNA-dependente, respectivamente. Provavelmente, a ORF1a também codifica sinais de localização nuclear. A ORF2 (~2.400nt) codifica o precursor das três proteínas de capsídeo dos AstV humanos (Matsui, 2002; Méndez & Arias, 2007).

Em humanos, os AstV são encontrados no mundo todo e estão associados a casos de diarreia aguda ou persistente, sendo responsáveis por cerca de 4-10% dos casos de diarreia em crianças (Giordano *et al.*, 2001; Dalton *et al.*, 2002; Guix *et al.*, 2002; Rodrigues-Baez *et al.*, 2002).

Figura 8. Estrutura das partículas e micrografia eletrônica do Astrovírus.



(Fonte: www.lifesciences.umich.edu/images/Adenovirus-Metzger.jpg,
www.nlv.ch/Astrovirus/graphics/Astroempicutre1.jpg, acesso 24/04/2008)

A doença causada por AstV em humanos é caracterizada primariamente pela diarreia, embora vômito, dores abdominais e desidratação branda também sejam ocasionalmente observadas. Geralmente, o quadro clínico é menos grave do que o causado pela infecção por RV, não requer hospitalização e se resolve espontaneamente (Méndez & Arias, 2007).

9.1. Epidemiologia e Manifestações Clínicas de AstV em Imunocomprometidos

As características e a frequência da doença por Astv em pacientes imunossuprimidos não são bem conhecidas. A excreção prolongada do vírus já foi observada em pacientes submetidos a transplante de medula óssea (Cox *et al.*, 1994; Cubitt *et al.*, 1999) e pacientes submetidos à TOS (Rodriguez-Baez *et al.*,

2002). O estudo de um caso de uma criança que recebeu transplante de medula óssea mostrou que, apesar da diarreia aguda, as anormalidades morfológicas foram relativamente poucas e não específicas e a resposta inflamatória foi baixa. Apesar de o paciente ser imunocomprometido, o que explicaria a baixa resposta imunológica, ocorreram reações inflamatórias [agudas e crônicas] bem caracterizadas para outras complicações que ocorrem em pacientes transplantados (Sebire *et al.*, 2004).

Estudos têm relatado a infecção por astrovírus em pacientes HIV-positivos (Grohmann *et al.*, 1993; González *et al.*, 1998; Giordano *et al.*, 1999; Thomas, Pollock & Gazzard, 1999; Liste *et al.*, 2000; Trevino *et al.*, 2001; Rossite *et al.*, 2007). Nesses pacientes as infecções tendem ser sintomáticas e prolongadas (Rodríguez-Baez *et al.*, 2002).

10.0. Diagnóstico Laboratorial das Infecções Virais Entéricas

A doença diarreica é uma complicação frequente em pacientes imunocomprometidos, contudo, para a maioria das causas de diarreia, os sintomas clínicos são inespecíficos e o diagnóstico laboratorial em geral é lento e caro, e requer conhecimento em técnicas de diagnóstico parasitológico, bacteriológico e virológico. Se a suspeita recair sobre um agente viral, pode-se recorrer aos imunoenaios, isolamento viral e identificação de anormalidades histopatológicas. Contudo, além de serem técnicas pouco sensíveis, alguns vírus entéricos não são identificados por esses métodos. Técnicas de diagnóstico

molecular, tais como PCR e RT-PCR, e PCR em tempo real, foram estabelecidas para o diagnóstico de vírus entéricos, aumentando assim a possibilidade de detecção desses patógenos (Minosse *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2005; Logan, O'Leary, & O'Sullivan, 2006; Lu *et al.*, 2006; Royuela, Negredo, & Sánchez-Fauquier, 2006; Trujillo *et al.*, 2006; Drew, 2007). Essas técnicas, se aplicadas ao diagnóstico de enterites em pacientes imunocomprometidos, podem ser extremamente valiosas para auxiliar o tratamento, melhorando assim o prognóstico desses indivíduos, além de permitir acessar o papel dessas infecções entéricas nessa população. Infelizmente, poucos laboratórios estão aptos a realizar o diagnóstico rotineiro de diarreia viral, com base em testes moleculares, seja devido ao elevado custo desses ensaios [agravado pelo grande número de patógenos que poderiam estar causando a doença], seja devido à ausência de expertise. Uma forma de viabilizar o uso rotineiro do diagnóstico molecular de diarreias virais, particularmente em pacientes imunossuprimidos, seria a elaboração de um algoritmo para aplicação na rotina diagnóstica, com o objetivo de agilizar e otimizar a investigação de patógenos virais nesses pacientes. Para tal, é fundamental o conhecimento da prevalência dos diversos vírus causadores de diarreia em indivíduos imunocomprometidos, a fim de que sejam determinados quais agentes devem ser pesquisados prioritariamente reduzindo assim o número de testes realizados por paciente e conseqüentemente reduzindo o custo do exame.

11. OBJETIVOS

Objetivo Principal

Detectar a presença e avaliar a importância dos seguintes vírus como agentes de infecções entéricas em pacientes imunocomprometidos atendidos no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ: vírus da família *Herpesviridae* (citomegalovírus, vírus Epstein-Barr e vírus herpes simplex tipos 1 e 2), adenovírus, bocavírus, rotavírus dos grupo A, B e C, norovírus e astrovírus.

Objetivos secundários

1. Avaliar a importância de técnicas moleculares no auxílio ao diagnóstico das infecções virais entéricas.
2. Estabelecer protocolos eficazes para diagnóstico das infecções virais entéricas que possam ser oferecidos e utilizados rotineiramente em laboratório de diagnóstico clínico.
3. Estabelecer um algoritmo para aplicação na rotina diagnóstica, com o objetivo de agilizar e otimizar a investigação de enterites virais em pacientes imunocomprometidos.

12. MATERIAIS E MÉTODOS

12.1. Amostras Clínicas:

Foram analisadas 150 amostras fecais de pacientes imunocomprometidos, apresentando quadro de diarreia, hospitalizados ou não. Essas amostras foram provenientes do laboratório de Coprologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), para onde haviam sido encaminhadas para fins de análises clínicas (exame parasitológico de fezes - EPF). Após a realização do exame parasitológico, todas as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Virose Respiratórias, Entéricas e Oculares (LAVIREO) do Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ, independentemente do resultado do EPF, para pesquisa de vírus. As amostras permaneceram estocadas a -20°C até o momento do exame. A coleção foi composta por amostras coletadas de agosto de 2006 a dezembro de 2007.

12.2. Aspectos Éticos

O presente protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUCFF, e está em consonância com a Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

12.3. Critérios de Inclusão e Exclusão

12.3.1. Critérios de inclusão:

- indivíduos imunocomprometidos, com quadros de diarreia, de qualquer idade, que tenham procurado atendimento no HUCFF, cujo material fecal tenha sido

encaminhado ao laboratório de Coprologia para fins de análises clínicas (exame parasitológico de fezes - EPF).

12.3.2. Critérios de exclusão:

- indivíduos imunocomprometidos para os quais não foi solicitado EPF no laboratório de Coprologia.

12.4. Definição de termos

Diarréia: indivíduos com fezes cuja consistência revele aumento de conteúdo líquido (pastosa, aquosa), com ou sem vômito ou febre ($>38^{\circ}\text{C}$), com maior número de dejeções diárias.

12.5. Metodologia para realização dos EPF e Coprocultura.

Os exames parasitológicos das fezes foram realizados através dos métodos de Hoffman, Pons e Janer (para pesquisa de ovos de helmintos e cistos de protozoários) e Baerman-Moraes (para pesquisa de larvas de helmintos). A coloração de Zielh-Nielsen à quente, específica para pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Isospora belli*, foi realizada, conforme solicitação médica, para 83 das 87 amostras de pacientes com AIDS.

Para proceder a coprocultura, também realizada somente quando havia solicitação médica, procedeu-se da seguinte forma: as fezes eram semeadas em placa com meio de cultura apropriado e posteriormente fazia-se a triagem das

bactérias eventualmente presentes, determinando se eram patogênicas ou não. Sendo patogênicas, a técnica prosseguia na identificação até o nível de espécie, através de métodos bioquímicos ou automatizados, dependendo do tipo de bactéria detectada. Também era realizado o antibiograma para verificar a sensibilidade da mesma aos antimicrobianos.

12.6. Criação do Banco de Dados:

- a fim de facilitar a análise dos resultados foi criado um banco de dados a partir de informações obtidas sobre os pacientes, tais como data de coleta, idade, tipo de imunodeficiência, tipo e duração dos sintomas.

12.7. Controles Positivos:

Foram utilizados como controles positivos dos testes moleculares: para CMV, cultura de fibroblastos humanos infectados com a cepa AD169; para HSV 1 e 2, cultura de células Vero infectadas com cepas do HSV-1 e 2 ACV-r, [resistente ao aciclovir]; para RV do grupo A, cultura de células MA-104 infectadas com a cepa SA-11; para Adv, cultura de células HEp-2 infectadas com uma cepa de Adv-3; para HBoV, DNA viral extraído de amostras fecais confirmadamente infectadas por esse vírus; para EBV, cultura de células Daudi permanentemente infectadas por EBV. Para RV dos grupos B e C, NoV e AstV não tivemos controle positivo. Neste caso, as amostras eventualmente positivas seriam seqüenciadas, para confirmação dos resultados.

12.8. Detecção de Vírus com Genoma de RNA

12.8.1. Extração do RNA Viral

A extração do RNA viral foi realizada utilizando-se o kit *RNAagents® Total RNA Isolation System* [Promega, Madison – WI, EUA], de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, suspensões fecais a 10% - 20% preparadas em tampão salina-fosfato [PBS] pH 7,2 foram submetidas a clarificação por centrifugação a 2500 x *g* por 5 min. Em tubos tipo eppendorf de 1,5mL foram adicionados 400 μ L da suspensão fecal, 300 μ L da solução desnaturante e 30 μ L de solução de acetato de sódio 2M (pH 4,0). O material foi misturado invertendo-se os tubos 3 a 5 vezes e mantido à temperatura ambiente por cinco minutos. Em seguida, foi adicionado 300 μ L da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, os tubos foram fechados, invertidos 3 a 5 vezes e então agitados por 10 segundos em vortex e mantidos 15 minutos em gelo. Em seguida o material foi centrifugado a 10.000x *g*/20min; a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo onde foi, então, acrescentado um volume equivalente de isopropanol e as amostras foram incubadas a -20°C /5min para precipitação do RNA. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000x *g*/10min. O sedimento foi então lavado com 1mL de etanol 75% gelado e centrifugado a 10.000x *g*/10min. O sedimento foi seco por evaporação, novamente suspenso em 50 μ L de água destilada estéril e estocado a -20°C , até o momento do uso.

12.8.2. Detecção de RNA viral através de RT-PCR:

Para os vírus de genoma de RNA, tais como os RV, AstV e NoV, antes da amplificação por PCR, foi realizada, inicialmente uma etapa de transcrição reversa para produção do DNA complementar [cDNA]. Para isso, 5 μ l do RNA viral foi adicionado a um tubo de PCR, misturado a 1 μ L de dimetil sulfóxido [DMSO] e aquecido a 97°C por 5 min. Após este período, foi adicionada à suspensão 5,1 μ l da seguinte mistura: 1 μ L de água destilada; 0,5 μ L da mistura de dideoxynucleotídeos trifosfato [contendo soluções 1.25mM de dATP, dGTP, dCTP, e dTTP cada]; 2 μ L de tampão 5x concentrado [contendo Tris-HCl 100mM, pH 9.0, KCl 500mM, e 1% de Triton X-100]; 1,2 μ L da solução de cloreto de magnésio 25mM; 0,2 μ L da solução de oligonucleotídeos específicos para cada vírus [ver Quadro 2] e, 0,2 μ L da enzima transcriptase reversa. A mistura foi então incubada a 25°C por 5 min [hibridização], seguida por 42°C por 45 min para a etapa de transcrição reversa. Após esse procedimento, as amostras foram submetidas a ciclos diferenciados de PCR, de acordo com os diferentes vírus pesquisados [ver Quadro 3]. As amplificações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer modelo 2400, em tubos eppendorfs de 0,2mL, contendo 5 μ L de DNA e 20 μ L da *Master Mix* que consiste de: 15,1 μ L de água destilada; 0,5 μ L da mistura de dideoxynucleotídeos trifosfato [dNTPs - 1.25mM de dATP, dGTP, dCTP, e dTTP cada]; 2,5 μ L de tampão da enzima [Taq polimerase] 10x concentrado [Tris-HCl 100mM, pH 9.0, KCl 500mM e 1% de Triton X-100]; 1,5 μ L da solução de cloreto de magnésio [MgCl] 25mM; 0,2 μ L da solução de oligonucleotídeos e 0,2 μ L da enzima Taq polimerase.

Finalmente, alíquotas de 10 μ L do produto do PCR foram aplicadas em gel de agarose 1,2% e foi procedida a eletroforese a 120V por 1 hora. O gel foi corado com brometo de etídio e analisado por transiluminação com luz UV. No caso dos rotavírus, os produtos do PCR foram utilizados posteriormente numa reação de *Nested-PCR*. Nesta etapa, 5 μ L dos produtos amplificados na PCR foram acrescidos de 20 μ L da mistura de PCR descrita acima, não ocorrendo mudança no ciclo utilizado [ver Quadro 3]. Novamente, alíquotas de 10 μ L do produto gerado foram aplicadas em gel de agarose 1.2% e procedida a eletroforese a 120v por 1 hora. O gel foi corado com brometo de etídio, analisado por transiluminação com luz UV e fotografado com máquina Polaroid. Os diferentes tamanhos de fragmentos gerados na PCR e *Nested-PCR* estão especificados no Quadro 2.

12.9. Detecção de Vírus com Genoma de DNA

12.9.1. Extração de DNA viral:

A extração do DNA viral foi realizada utilizando-se o kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Alíquotas de 400 μ L da suspensão fecal foram transferidas para tubos eppendorfs de 1,5mL contendo 300 μ L da solução de lise nuclear e 3 μ L da solução RNase. Os tubos foram, então, misturados por inversão e incubados por 15-30 min em banho-maria 37°C. Após a incubação, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 5 min para esfriarem. Foram, então, adicionados 200 μ L da solução de precipitação de proteínas, os tubos foram agitados em vortex e incubados em gelo por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 4 min e o

sobrenadante transferido para outro tubo contendo 600 μ L de isopropanol. Os tubos foram misturados por inversão e deixados à temperatura ambiente, por 30 min. Decorrido esse período os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 1 min e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 600 μ L de etanol 70% e os tubos foram novamente centrifugados a 12000 x g por 1 min. Os sobrenadantes foram novamente descartados e os tubos foram deixados abertos à temperatura ambiente, até que o precipitado estivesse seco. O sedimento foi suspenso em 65 μ L da solução de reidratação de DNA, incubado a 65°C por 1h e os tubos foram estocados a -20°C até o momento do uso.

12.9.2. Detecção de DNA viral através de PCR:

Para detecção dos vírus de genoma de DNA [HSV-1, HSV-2, EBV, CMV, AdV e HBoV] foram aplicados ciclos diferenciados de PCR, de acordo com os diferentes vírus pesquisados [Quadro 3]. As amplificações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer modelo 2400, em tubos eppendorfs de 0,2mL, contendo 5 μ L de DNA e 20 μ L da *Master Mix* que consiste de: 15,1 μ L de água destilada [14,8 μ L para os vírus da família *Herpesviridae*]; 0,5 μ L da mistura de dideoxynucleotídeos trifosfato [dNTPs - 1.25mM de dATP, dGTP, dCTP, e dTTP cada]; 2,5 μ L de tampão da enzima [Taq polimerase] 10x concentrado [Tris-HCl 100mM, pH 9.0, KCl 500mM e 1% de Triton X-100]; 1,5 μ L da solução de cloreto de magnésio [MgCl] 25mM; 0,2 μ L da solução de oligonucleotídeos [0,5 μ L para os vírus da família *Herpesviridae*] e 0,2 μ L da enzima Taq polimerase.

Finalmente, alíquotas de 10 μ L do produto do PCR foram aplicadas em gel de agarose 1.2% e foi procedida a eletroforese a 120v por 1 hora. O gel foi corado com brometo de etídio e analisado por transiluminação com luz UV. Para os herpesvírus, os produtos do PCR foram utilizados numa *Nested-PCR*. Nesta etapa, 5 μ L foram acrescidos de 20 μ L da mistura de PCR previamente utilizada, ocorrendo mudança no ciclo utilizado [Quadro 3]. Os diferentes tamanhos de fragmentos gerados estão especificados no Quadro 2. Novamente, Alíquotas de 10 μ L do produto gerado [segundo PCR] foram aplicadas em gel de agarose 1,2% e procedida a eletroforese a 120v por 1 hora. O gel foi corado com brometo de etídio e analisado por transiluminação com luz UV.

12.9.3. Reação de semi-quantificação do DNA de HBoV

As duas amostras positivas para HBoV foram semi-quantificadas afim de que se pudesse estimar a carga parasitária do vírus detectado. Esta reação baseou-se em diluições seriadas do DNA extraído dessas amostras com posterior realização da PCR e aplicação em gel de agarose 1.2% para proceder a eletroforese a 120v por 1 hora, como descrito no item 12.8.2. O objetivo foi verificar até que diluição era possível detecção dos fragmentos.

12.10. Sequenciamento dos produtos amplificados para confirmação dos vírus detectados:

Com a finalidade de confirmação da positividade, determinação dos sorotipos e desconsideração de possíveis contaminações foi realizado o

seqüenciamento dos produtos gerados por PCR de algumas amostras selecionadas. Para tal, foram seguidas as seguintes etapas:

12.10.1. Purificação do produto obtido na PCR:

Os produtos da PCR foram purificados através da utilização do *kit Wizard*[®] *SV Gel and PCR Clean-Up System* [Promega], de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados 40µL de cada produto obtido na PCR, sendo adicionado igual volume de solução de ligação à membrana. Em um microtubo com capacidade para 2mL, para cada amostra a ser purificada, foi montada a minicoluna SV, transferindo-se a mistura, produto de PCR mais solução de ligação, para o mesmo e incubando-se por um minuto a temperatura ambiente [25°C]. Após a incubação, os produtos foram centrifugados a 10.000x g por um minuto. Em seguida, foram adicionados 700µL da solução de lavagem da membrana e o tubo foi, novamente, centrifugado a 10.000x g por 1min, sendo descartado o microtubo de coleta e o suporte da coluna transferido para um novo microtubo. Finalmente foram adicionados 40µL de água destilada estéril e os tubos, novamente, centrifugados a 10.000x g por cinco minutos.

12.10.2. Quantificação do produto da PCR purificado:

Uma vez purificados, os cDNAs foram quantificados por comparação com um padrão de massa molecular [*Low DNA Mass Ladder* – Invitrogen, Carlsbad – CA]. Uma mistura de 5µL do DNA e 2µL de *loading buffer* 6x foi aplicada num gel de agarose 1,2% como descrito no item 12.8.2.

12.10.3. Reação de seqüenciamento (*Cycle Sequencing*):

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o *kit ABI BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Read Reaction v3.1* [Applied Biosystems - EUA], de acordo com as recomendações do fabricante. Esta etapa do trabalho foi realizada no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ.

12.10.4. Análise das seqüências:

As seqüências nucleotídicas obtidas foram analisadas, utilizando os programas BLAST [www.ncbi.nlm.gov/BLAST], e Chromas [Technelysium Pty Ltd, Austrália].

12.11. Análise Estatística

A análise estatística das amostras deste estudo foi realizada por Teste do Qui-quadrado e Tabela de Contingência, para verificar associações e cálculo do Risco Relativo. O critério de decisão foi o P-valor, sendo considerado significativo os valores de $P < 0,05$.

Quadro 2: Relação dos oligonucleotídeos utilizados para todos os vírus pesquisado.

| Oligonucleotídeos | Seqüência 5' → 3' | Amplicon | Referência |
|------------------------------|-----------------------------|----------|---|
| Astrovírus | | | |
| MON269 | CAACTCAGGAAACAGGGTGT | 449pb | Noel <i>et al.</i> , 1995 |
| MON270 | TCAGATGCATTGTCATTGGT | | |
| Norovírus | | | |
| Cap A | GGC WGT TCC CAC AGG CTT | 177pb - | Vinjé, Hamidjaja & Sobsey, 2004 |
| CapB1 | TAT GTT GAC CCT GAT AC | | |
| CapB2 | TAT GTI GAY CCW GAC AC | | |
| CapC | CTT TYC CAK WTC CCA YGG | 253pb – | Vinjé, Hamidjaja & Sobsey, 2004 |
| CapD1 | TGT CTR STC CCC CAG GAA TG | | |
| CapD3 | TGY CTY ITI CCH CAR GAA TGG | | |
| Rotavírus | | | |
| Grupo A - RT-PCR | | | |
| VP6-F | GACGGVGCRACTACATGGT | 610pb | Iturriza-Gómara <i>et al.</i> , 2002 Santos <i>et al.</i> , 1998 |
| END6 | GGTCACATCCTCTCACTATAC | | |
| Grupo A - <i>Nested</i> -PCR | | | |
| VP6-F | GACGGVGCRACTACATGGT | 380pb | Iturriza-Gómara <i>et al.</i> , 2002 |
| VP6-R | GTCCAATTCATNCCTGGTGG | | |
| Grupo B - RT-PCR | | | |
| B1 | CTATTCAGTGTGTCGTGAGAGG | 489pb | Gouvea <i>et al.</i> , 1991 |
| B4 | CGTGGCTTTGGAAAATTCTTG | | |
| Grupo B - <i>Nested</i> -PCR | | | |
| B1 + | | 434pb | Gouvea <i>et al.</i> , 1991 |
| B3 | CGAAGCGGGCTAGCTTGTCTGC | | |
| Grupo C - RT-PCR | | | |

| | | | |
|-------------------------------------|---------------------------|---|-------------------------------------|
| C1 | CTCGATGCTACTACAGAATCAG | 356pb | Gouvea <i>et al.</i> , 1991 |
| C4 | AGCCACATAGTTCACATTTTCATCC | | |
| Grupo C - Nested-PCR | | | |
| C1 + | | 327pb | Gouvea <i>et al.</i> , 1991 |
| C3 | GGGATCATCCACGTCATGCG | | |
| Adenovirus | | | |
| Hex1deg | GCCSCARTGGKCWTACATGCACATC | 301pb | Allard, Albinsson & Wadell, 2001 |
| Hex2deg | CAGCACSCCICGRAT GTCAAA | | |
| Herpesvirus (HSV, EBV e CMV) | | | |
| 1° PCR | | | |
| HHV-F1 | GTCGTGTTTGACTTTGCCAGC | HSV1/2 - 742pb EBV- 748pb CMV- 817pb | Tafreshi <i>et al.</i> , 2005 |
| HHV-R1 | GTCTTGCGCACCAGATCCAC | | |
| Nested-PCR | | | |
| HHV-F2 | GCATCATCCTGGCTCACAACC | HSV1/2 - 493pb EBV- 499pb CMV- 565pb | Tafreshi <i>et al.</i> , 2005 |
| HHV-R2 | GTCCGTGTCCCCGTAGATG | | |
| Bocavirus | | | |
| HBoV 01.2 | TATGGCCAAGGCAATCGTCCAAG | 299pb | Sloots <i>et al.</i> , 2006 |
| HBoV 02.2 | GCCGCGTGAACATGAGAAACAGA | | |

Quadro 3: Ciclo de PCR e *Nested-PCR* aplicado à cada vírus pesquisado.

| Vírus | Ciclo | |
|----------------------------------|--|--|
| | PCR | Nested-PCR |
| Astrovírus | 94°C/3'; 35x(94°C/30"; 50°C/30"; 72°C/1'30"); 72°C/5'; 4°C∞ | --- |
| Norovírus | GI 95°C/15'; 40x (94°C/1', 40°C/1', 72°C1'30"); 72°C/10'; 4°C∞ GII 94°C/3'; 40x (94°C/1', 44°C/1', 72°C1'); 72°C/7'; 4°C∞ | --- |
| Rotavírus A, B e C | 95°C/2'; 40x (94°C/30", 40°C/1', 72°C1'30"); 72°C/5'; 4°C∞ | 95°C/2'; 40x (94°C/30", 40°C/1', 72°C1'30"); 72°C/5'; 4°C∞ |
| Adenovírus | 94°C/3'; 35x (94°C/30", 50°C/30", 72°C1'); 72°C/5'; 4°C∞ | --- |
| Herpesvírus (CMV, EBV, HSV 1, 2) | 94°C/3'; 35x (94°C/45", 65°C/1', 72°C/1'); 72°C/7'; 4°C∞ | 94°C/3'; 35x (94°C/45", 63°C/1', 72°C/1'); 72°C/7'; 4°C∞ |
| Bocavírus | 94°C/15'; 45x (94°C/20", 56°C/20", 72°C/30"); 4°C∞ | --- |

13. RESULTADOS

No presente estudo foram analisadas 150 amostras fecais provenientes de 147 pacientes imunocomprometidos, apresentando sintomas de diarreia, internados ou não no HUCFF. Três pacientes portadores de AIDS forneceram duas amostras. Entre esses pacientes 84 pertencem ao sexo masculino e 63 ao sexo feminino.

Os quadros de imunodeficiência mais comumente observados foram: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida [AIDS] (87 pacientes/90 amostras, 59,2%, n=150), transplantados renais [TxR] (21 pacientes, 14,3%), transplantados de medula óssea [TMO] (8 pacientes, 5,4%), portadores de insuficiência renal crônica [IRC] (4 pacientes, 2,7%) e de neoplasias [linfomas/leucemias e tumores] (11 pacientes, 7,5%). Outros pacientes imunocomprometidos apresentavam diagnósticos como lúpus eritematoso sistêmico (LES), paracoccidomicose, pênfigo vulgar, hepatite C, neuropatia, esquistossomose, histoplasmose, herpes-zoster, artrite gonocócica, *diabetes mellitus*, psoríase ou idade avançada que representavam 10,9% (16 pacientes) do total de pacientes. Alguns pacientes apresentavam duplo diagnóstico tais como, AIDS/Linfoma, AIDS/hepatite C, AIDS/tuberculose disseminada, etc. Nestes casos a imunodeficiência considerada para efeito de análise dos resultados foi AIDS, visto que os demais quadros podem representar doenças oportunistas, presentes em virtude da imunodeficiência provocada por infecção pelo HIV. Três pacientes possuíam os diagnósticos de TxR/hepatite C, TxR/LES e TMO/leucemia, sendo incluídos na categoria de transplantados [Tabela 1].

Tabela 1. Quadro de tipos de imunodeficiências apresentadas pelos pacientes cujas amostras fecais foram analisadas neste estudo.

| Tipo de Imunodeficiência¹ | Nº de Pacientes/ (%) |
|---|-----------------------------|
| AIDS | 87 (59,2) |
| Transplantados (TxR e TMO) | 29 (19,7) |
| Neoplasias (Linfomas/Leucemias/Tumores) | 11 (7,5) |
| IRC | 4 (2,7) |
| Outras | 16 (10,9) |
| Total | 147 |

¹AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. TxR – transplante renal, TMO – transplante de medula óssea. IRC = Insuficiência Renal Crônica. Outros diagnósticos de imunocomprometimento incluíram lúpus eritematoso sistêmico (LES), paracoccidioomicose, pênfigo vulgar, hepatite C, neuropatia, esquistosomose, histoplasmose, herpes-zoster, artrite gonocócica, *diabetes mellitus*, psoríase, idade avançada.

A maioria dos pacientes (114/147; 77,6%) estava hospitalizada no momento da coleta da amostra, 33 (22,4%) não estavam hospitalizados. Três pacientes tiveram suas amostras coletadas duas vezes, em períodos diferentes, tendo sido observados resultados semelhantes em ambas as amostras.

Os vírus pesquisados neste estudo compreenderam vírus com genoma composto por DNA (citomegalovírus [CMV], vírus herpes simplex 1 e 2 [HSV-1 e HSV-2], vírus Epstein-Barr [EBV], adenovírus [AdV] e bocavírus [HBoV]); vírus com genoma composto por RNA (rotavírus - grupos A, B e C [RV-A, RV-B e RV-C], norovírus [NoV] e astrovírus [AstV]). Não houve positividade entre os vírus

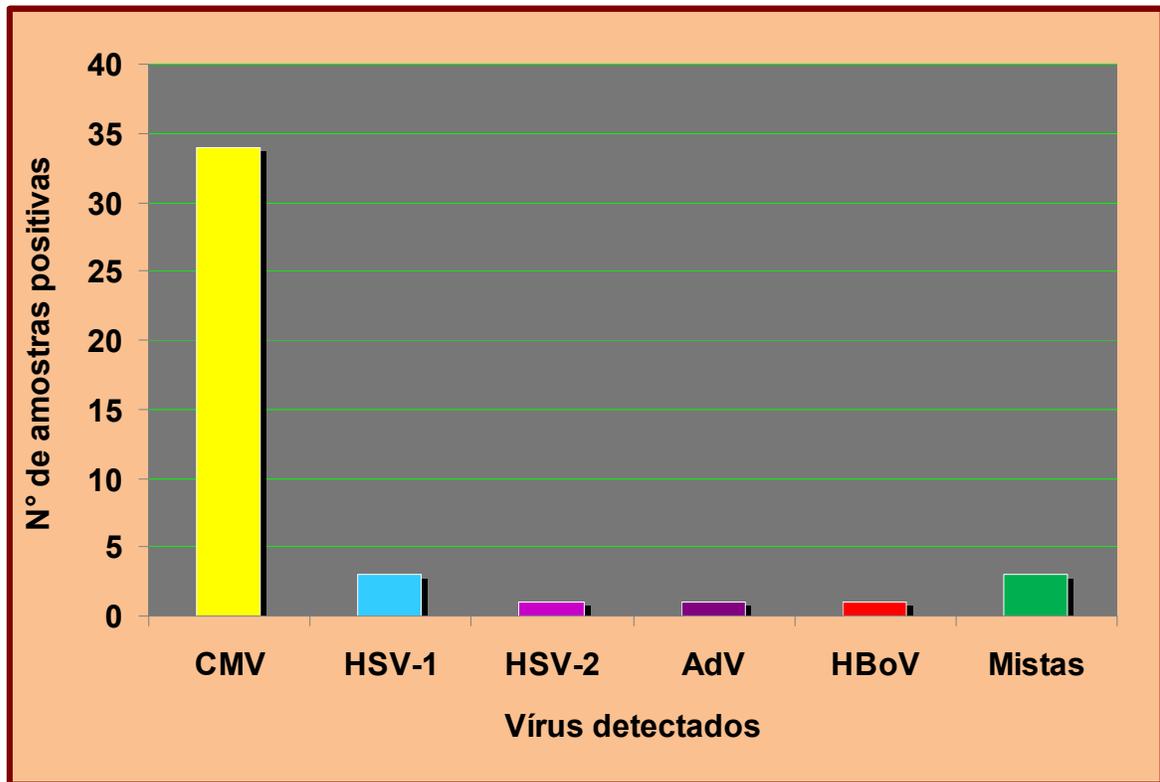
compostos por RNA. Já para os demais, com genoma DNA, foram detectadas 43 amostras positivas, oriundas de 42 pacientes, apresentando, portanto, um índice de positividade de 28,7% (43/150): 34 amostras foram positivas para CMV (79,1%, 34/43), 3 amostras foram positivas para HSV-1 (7%, 3/43), 1 amostra positiva para HSV-2 (2,3%, 1/43), 1 amostra positiva para AdV (2,3%, 1/43) e 1 amostra positiva para HBoV (2,3%, 1/43). Três casos de co-infecção (7%, 3/43) [2 CMV+AdV, 1 caso CMV+HBoV], puderam ser identificados, não sendo diagnosticados casos positivos para EBV. Esses dados estão expostos na Tabela 2 e representados no Gráfico 1.

Tabela 2. Positividade das amostras fecais analisadas para os diferentes vírus pesquisados.

| Vírus Diagnosticados | Nº de amostras positivas (%) |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| HSV-1 | 3 (7) |
| HSV-2 | 1 (2,3) |
| EBV | 0 (0) |
| CMV | 34 (79,1) |
| AdV | 1 (2,3) |
| HBoV | 1 (2,3) |
| RV-A/RV-B/RV-C | 0 (0) |
| NoV | 0 (0) |
| AstV | 0 (0) |
| Infecções mistas ¹ | 3 (7) |
| Total | 43 (100) |

¹02- CMV + Adv; 01 - CMV + HBoV.

Gráfico 1. Representação gráfica dos resultados das amostras fecais positivas quanto a detecção de vírus.

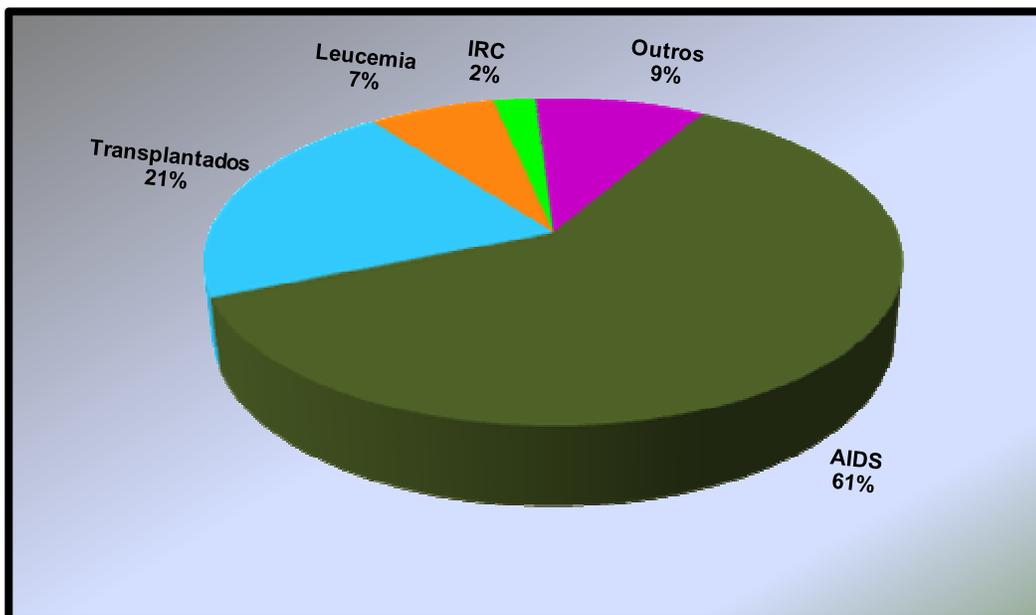


O sequenciamento confirmou a positividade das amostras encaminhadas para análise e descartou possíveis contaminações, principalmente no que se referia ao significativo número de amostras positivas para CMV, embora em todos os ensaios o controle negativo tenha se confirmado negativo. As seqüências analisadas das 15 amostras positivas para CMV revelaram uma maior indentidade com o CMV-Merlin A4446894, enquanto que o controle positivo utilizado nas reações de PCR, que também foi seqüenciado, era a amostra CMV-AD169 BR000394.

As três amostras positivas para adenovírus confirmaram seus resultados embora em duas delas não tenha sido possível identificar o sorotipo devido a seqüência não ter permitido um alinhamento perfeito. A terceira amostra foi identificada como pertencente ao sorotipo 49. As duas amostras de HBoV confirmaram serem pertencentes à espécie *Bocavirus humano*, assim como as 4 amostras de HSV, também confirmaram pertencerem ao gênero *Simplexvirus*, sendo 3 amostras HSV do tipo 1 e uma do tipo 2.

Com relação à distribuição das amostras positivas em relação ao tipo de imunodeficiência, observa-se que as amostras provenientes de pacientes com AIDS representaram 61% do total de amostras positivas (26/43), enquanto que as amostras de pacientes transplantados representaram 21%, pacientes com neoplasias [leucemia] representaram 7%, portadores de IRC 2 % e portadores de outras síndromes 9% [Gráfico 2].

Gráfico 2. Distribuição percentual de infecção entérica viral entre os pacientes de acordo com a causa de imunodeficiência.



AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. TxR – transplantados renais, TMO – transplante de medula óssea. IRC = Insuficiência Renal Crônica. Outros diagnósticos de imunocomprometimento incluíram lúpus eritematoso sistêmico (LES), paracoccidioomicose, pênfigo vulgar, hepatite C, neuropatia, esquistossomose, histoplasmose, herpes-zoster, artrite gonocócica, *diabetes mellitus*, psoríase, idade avançada.

Quanto à frequência de detecção de cada um dos vírus pesquisado, em relação ao tipo de imunodeficiência, os dados demonstram que 29,9% (26/87) dos pacientes com AIDS apresentavam infecção entérica por algum vírus. Entre estes, 73,1% (19/26) foram positivos para CMV, 3,85% (1/26) foram positivos para HSV-1, 3,85% (1/26) para HSV-2, 3,85% (1/26) para AdV, 3,85 (1/26) para HBoV e 11,5% (3/26) apresentavam infecção mista, por dois agentes virais. Com relação aos pacientes transplantados, 31% (9/29) apresentavam infecção por vírus. Destes, cinco TxR e dois TMO [77,8%, 7/9] foram positivos para CMV, e dois pacientes [1 TxR e 1 TMO] [22,2%, 2/9] foram positivos para HSV-1. Três pacientes portadores de neoplasia [leucemia] [27,3%, 3/11] foram positivos para

CMV. Um paciente com IRC [25%, 1/4] foi positivo para CMV e quatro pacientes portadores de outras síndromes [25%, 4/16] foram positivas para CMV [Tabela 3].

Tabela 3. Resultados da pesquisa viral das amostras fecais, em relação ao tipo de imunodeficiência apresentada pelos pacientes.

| Tipo de Imunodeficiência¹ | Vírus | Nº de casos positivos |
|---|-------------------------------|------------------------------|
| AIDS | CMV | 19 |
| | HSV-1 | 1 |
| | HSV-2 | 1 |
| | AdV | 1 |
| | HBoV | 1 |
| | Infecções mistas ² | 3 |
| Transplantados (TxR e TMO) | CMV | 7 |
| | HSV-1 | 2 |
| Neoplasia (leucemia) | CMV | 3 |
| IRC | CMV | 1 |
| Outras | CMV | 4 |
| Total | | 43 |

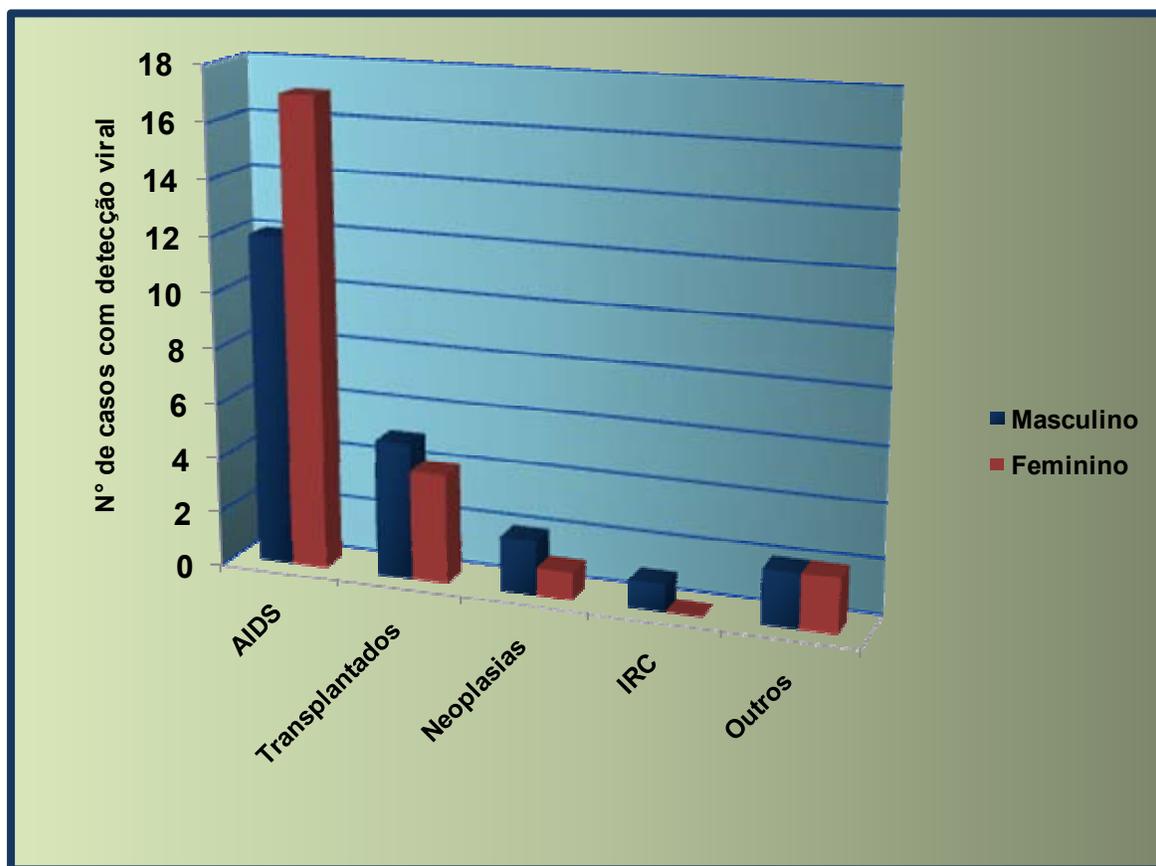
¹AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. TxR – transplante renal, TMO – transplante de medula óssea. IRC = Insuficiência Renal Crônica. Outros diagnósticos de imunocomprometimento incluíram lupus eritematoso sistêmico (LES), paracoccidioomicose, pênfigo vulgar, hepatite C, neuropatia, esquistosomose, histoplasmose, herpes-zoster, artrite gonocócica, *diabetes mellitus*, psoríase, idade avançada. ²02- CMV + Adv; 01 - CMV + HBoV.

Entre as amostras analisadas dos pacientes com AIDS, houve uma diferença significativa de prevalência de casos positivos entre homens e mulheres [$P = 0,020$]. Das 37 amostras de mulheres com esse diagnóstico, 17 [46%] foram positivas para algum vírus [sendo 16 com relação $TCD4^+/TCD8^+ < 1$] e entre as 53

amostras de homens somente 12 [22,6%] foram apresentaram positividade [27 amostras com relação $TCD4^+/TCD8^+ < 1$]. Essa diferença não foi observada com relação às demais síndromes. O Gráfico 3 representa a diferença das positivities virais entre os sexos observada nos diversos quadros de imunodeficiência. Em relação à média das idades, nos casos positivos de pacientes com AIDS a média foi de 42,5 anos para homens e 40,6 anos para mulheres, não havendo diferença significativa entre os sexos [$P = 0,531$], tanto para este diagnóstico quanto para as demais síndromes.

Dentre as 150 amostras pesquisadas, 43 foram positivas para vírus, 27 positivas para parasitos, sendo 90 delas negativas para todos os patógenos pesquisados [Tabela 4]. Para dez amostras, provenientes de nove pacientes, foram observadas co-infecção parasitária e viral [Tabela 5]. O exame de coprocultura foi realizado para 38 pacientes e forneceu resultados negativos para bactérias e fungos patogênicos. A frequência das infecções virais na população estudada foi significativamente mais elevada do que as infecções parasitárias [$P = 0,029$].

Gráfico 3. Relação entre detecção viral e sexo dos pacientes observada nos diversos quadros de imunodeficiência.



AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. TxR – transplante renal, TMO – transplante de medula óssea. IRC = Insuficiência Renal Crônica. Outros diagnósticos de imunocomprometimento incluíram lupus eritematoso sistêmico (LES), paracoccidioomicose, pênfigo vulgar, hepatite C, neuropatia, esquistosomose, histoplasmosse, herpes-zoster, artrite gonocócica, *diabetes mellitus*, psoríase, idade avançada.

Tabela 4. Distribuição da infecção por vírus, parasitos, bactérias e fungos entre as amostras analisadas.

| Tipo de Imunodeficiência ¹ | Detecção de patógenos entéricos | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|-----------|-----------------------|-----------|----------|-----------|
| | Vírus | Parasitos | Misturas ² | Bactérias | Fungos | Negativos |
| AIDS | 18 | 12 | 8 | 0 | 0 | 51 |
| Transplantados | 9 | 3 | 0 | 0 | 0 | 17 |
| Neoplasias | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 7 |
| IRC | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| Outras | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| Total | 33 | 17 | 10 | 0 | 0 | 90 |

¹AIDS = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. TxR – transplante renal, TMO – transplante de medula óssea. IRC = Insuficiência Renal Crônica. Outros diagnósticos de imunocomprometimento incluíram lúpus eritematoso sistêmico (LES), paracoccidioomicose, pênfigo vulgar, hepatite C, neuropatia, esquistosomose, histoplasmosse, herpes-zoster, artrite gonocócica, *diabetes mellitus*, psoríase, idade avançada. ² misturas = co-infecção por vírus e parasitos.

Tabela 5. Casos de co-infecção parasitária e viral.

| Resultado do exame parasitológico ¹ | Co-infecção viral | Tipo de Imunodeficiência |
|--|----------------------|--------------------------|
| LSS + OOI | 1 (AdV) | AIDS |
| LSS | 1(HBoV+CMV) | AIDS |
| OOI | 3 (2CMV, 1 HBoV) | AIDS |
| CEH/DISPAR | 2 (CMV) | AIDS, Leucemia |
| GL | 2 (1 Adv+CMV, 1 CMV) | AIDS |
| OEV | 1 (CMV) | IRC |

¹LSS – larva de *Strongyloides stercoralis*; OOI – oocisto de *Isospora belli*; CEH/DISPAR – complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, GL – *Giardia lamblia*; OEV – ovos de *Enterobis vermicularis*.

Até o final do estudo, 24 pacientes haviam falecido [AIDS, 15; transplantados, 5; leucemia, 2; outros, 2]. Dentre esses pacientes, 10 não tinham apresentado resultado positivo para nenhum dos patógenos entéricos pesquisados [vírus/parasitos/bactérias]; nove apresentaram infecção por um patógeno viral, sendo uma infecção mista por CMV e AdV, dois apresentaram infecção apenas por parasitos e três apresentaram co-infecção por vírus e parasitos [1 CMV+CEH/Dispar; 1 CMV+GL e 1 CMV+AdV+GL] [Tabela 6]. Dentre os 14 pacientes falecidos que apresentaram infecção viral ou infecção mista com parasitos [mista com parasitos = 1 paciente], sete eram portadores de AIDS, três eram transplantados e um sofria de leucemia.

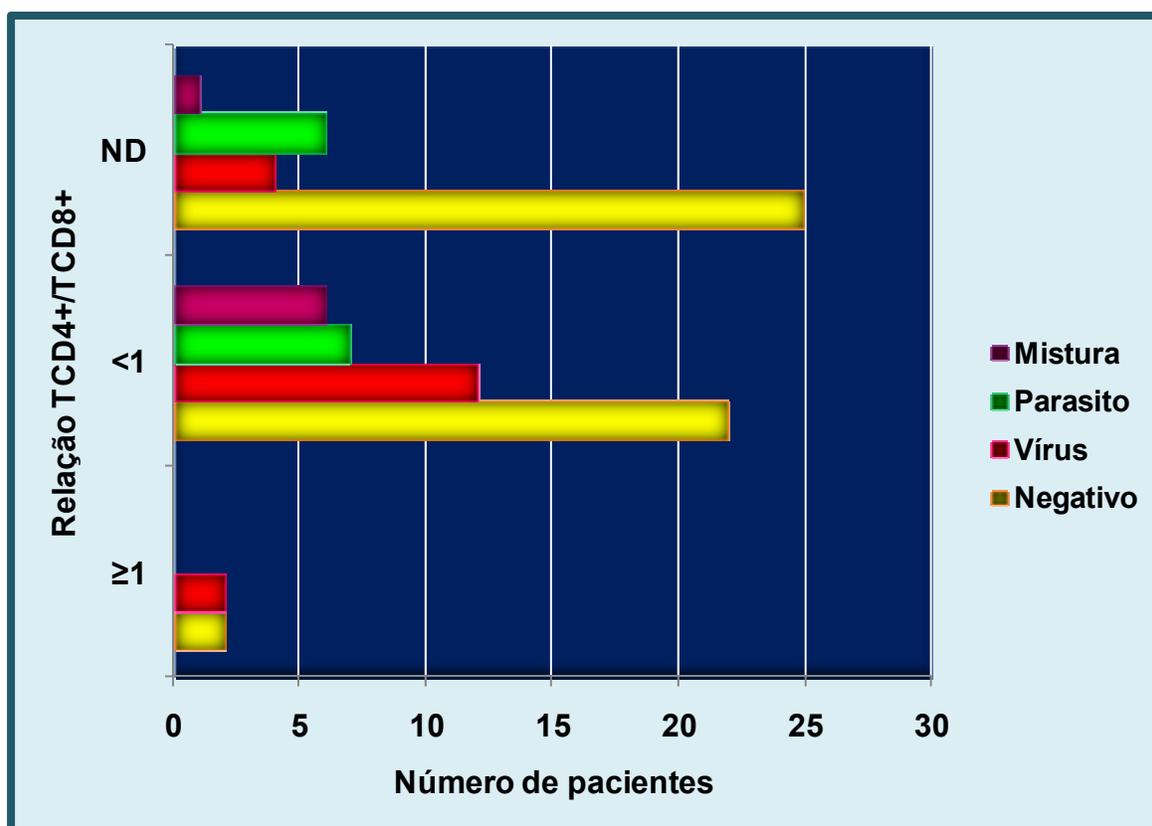
Tabela 6. Número de óbitos em relação à ocorrência de infecção entérica.

| Patógeno Entérico | Número de óbitos |
|--------------------------|-------------------------|
| Vírus | 9 |
| Parasitos | 2 |
| Infecção mista | 3 |
| Negativo | 10 |
| Total | 24 |

A relação TCD4⁺/TCD8⁺ foi obtida para 51 dos 87 pacientes com AIDS. Somente quatro pacientes apresentavam a relação TCD4⁺/TCD8⁺ ≥1, entre estes dois apresentavam infecção entérica por vírus e dois foram negativos para

patógenos entéricos. Os 47 pacientes restantes apresentaram uma relação $TCD4^+/TCD8^+ < 1$. Entre estes, 12 pacientes apresentavam infecção por vírus, sete apresentavam infecção por parasitos, seis apresentavam infecções mistas por vírus e parasitos e 22 foram negativos para patógenos entéricos [Gráfico 4].

Gráfico 4. A relação entre os índices de $TCD4^+/TCD8^+$ e a detecção de patógenos entéricos dos pacientes com AIDS.

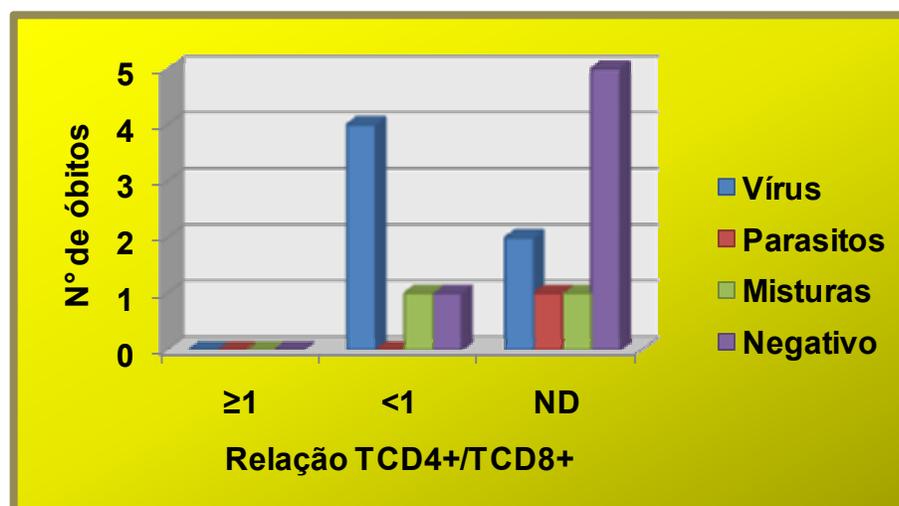


ND = não determinado

A relação entre infecção entérica, índice $TCD4^+/TCD8^+$ e número de óbitos está apresentada no Gráfico 5. Nenhum paciente que apresentava esse índice ≥ 1

faleceu; por outro lado, dentre os 47 pacientes com índice <1 , seis foram a óbito [para os demais pacientes que faleceram - entre os 15 com AIDS - a contagem $TCD4^+/TCD8^+$ não estava disponível]. Entre os seis óbitos, quatro apresentavam positividade para vírus somente [3 CMV, 1 CMV+Adv], um apresentava infecção mista por CMV+GL e um paciente não apresentava infecção por nenhum dos patógenos pesquisados. Para os demais pacientes que faleceram [nove pacientes] a contagem $TCD4^+/TCD8^+$ não estava disponível. Esses pacientes apresentaram infecção por vírus [2 casos CMV], parasitos [1 caso GL], ou mista [1 caso CMV+GL] e cinco pacientes foram negativos para os patógenos pesquisados. Em função do pequeno número de pacientes, não foi possível avaliar se houve significância estatística entre a taxa de $TCD4^+/TCD8^+$, a infecção entérica e óbito, entre esses pacientes.

Gráfico 5. Relação entre infecção entérica, índice $TCD4^+/TCD8^+$ e número de óbitos.



ND = não determinado

DISCUSSÃO

As desordens gastrointestinais estão entre as condições debilitantes mais comuns que atingem indivíduos portadores de AIDS/HIV (Ramos-Soriano *et al.*, 1996; de Jong *et al.*, 1999; Thomas, Pollock & Gazzard, 1999; Weber *et al.*, 1999; Pollock & Farthing, 2000), transplantados (Sebire *et al.*, 2004; Kaufman *et al.*, 2005; Ziring *et al.*, 2005; Ginsburg & Thuluvath, 2005; Mezerville *et al.*, 2006; Arslan *et al.*, 2007) e indivíduos com imunodeficiência primária (Bailly *et al.*, 2000; Gallimore *et al.*, 2004; Dray *et al.*, 2006). As gastroenterites agudas podem ser causadas por bactérias, parasitos e vírus, os sintomas incluem diarreia, náuseas, vômitos, mal-estar e em alguns casos podem levar ao óbito. Em pacientes imunocomprometidos, as gastroenterites virais podem causar diarreia grave e vômito, freqüentemente com excreção prolongada de vírus.

Em pacientes transplantados as conseqüências das infecções entéricas são variáveis e incluem diarreia grave aguda ou crônica, que podem ser acompanhadas de sangramento intestinal (Kingreen *et al.*, 1997; Pinchoff *et al.*, 2003; Sebire *et al.*, 2004; Ziring, 2005; Kaufman *et al.*, 2005; Tashiro *et al.*, 2006). Embora as evidências ainda não sejam conclusivas, diversos estudos têm sugerido a possibilidade de que infecções virais aumentem a chance de rejeição do transplante (Shirali *et al.*, 2001; Cainelli & Vento, 2002; Pinchoff *et al.*, 2003). Em algumas situações, a diferenciação entre enterite viral e rejeição do enxerto é difícil (Kaufman *et al.*, 2005; Ziring *et al.*, 2005). Dessa forma, a confirmação da infecção é fundamental porque os tratamentos dessas duas entidades clínicas são opostos. A redução da imunossupressão, motivada por um diagnóstico errôneo de

infecção pode precipitar um quadro de rejeição. Por outro lado, a intensificação da imunossupressão, quando a infecção viral está presente pode afetar o enxerto (Cainelle & Vento, 2002).

Em pacientes portadores de AID/HIV, infecções oportunistas do trato gastrointestinal são responsáveis por 60% - 90% das diarreias agudas e crônicas e são uma importante causa de morbidade e mortalidade nesses pacientes (Giordano *et al.*, 1999; Sabin *et al.*, 1999; Thomas, Pollock & Gazzard, 1999; Weber *et al.*, 1999; Cunliffe *et al.*, 2002; Rodríguez-Guillén *et al.*, 2005).

Contudo, com exceção das infecções por CMV, estabelecido como agente etiológico de doença do trato gastrointestinal nestes pacientes, o papel dos outros vírus entéricos permanece controverso. As infecções entéricas virais causadas por outros agentes que não o CMV, possivelmente, representam uma porção significativa das chamadas diarreias patógenos-negativas, em pacientes imunocomprometidos. Agentes como os rotavírus, norovírus, astrovírus, adenovírus, vírus herpes simplex, e vírus Epstein-Barr, têm sido implicados como agentes etiológicos de diarreia em imunocomprometidos (Stewart *et al.*, 1995; Sabin *et al.*, 1999; La Rosa *et al.*, 2001; Sebire *et al.*, 2004; Kaufman *et al.*, 2005; Ziring *et al.*, 2005; Tashiro *et al.*, 2006).

Neste trabalho foram avaliadas 150 amostras fecais, provenientes de 147 diferentes pacientes, portadores de algum tipo de imunodeficiência e que, no período de estudo, desenvolveram quadro de diarreia. Além da pesquisa de vírus,

foi realizado o exame parasitológico das fezes e em alguns casos também foi solicitada a coprocultura.

As amostras pertenciam a pacientes imunocomprometidos, de ambos os sexos, sem diferença significativa com relação ao número de suas amostras. As amostras foram coletadas no momento em que estes desenvolveram quadro de diarreia, o que direcionou aos clínicos a solicitação de exame parasitológico das fezes, sendo estas encaminhadas ao setor de coprologia do HUCFF e, posteriormente enviadas ao LAVIREO para pesquisa de vírus.

A pesquisa de vírus revelou a predominância das infecções entéricas por vírus compostos de genoma de DNA entre pacientes imunocomprometidos, particularmente CMV, HSV e AdV, conforme previamente já relatado na literatura (Helderman & Goral, 2002; Forrest, 2004; Thom & Forrest, 2006; Arslan *et al.*, 2007; Robin *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008).

O CMV foi o patógeno viral entérico detectado com maior frequência (79,1%). Esse achado é possivelmente justificado devido ao fato deste vírus estar fortemente associado a manifestações gastrointestinais em indivíduos imunocomprometidos, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade nesses pacientes (Kishore *et al.*, 2004; Gisburg & Thuluvath, 2005; Ponticelli & Passerini, 2005; Ziring *et al.*, 2005; Wade 2006; Arslan *et al.*, 2007). Há diversos casos na literatura mostrando que os pacientes com doença inflamatória intestinal já estabelecida, podem desenvolver um quadro de exacerbação aguda,

secundária à infecção por citomegalovírus, na maioria dos casos em pacientes que estavam na vigência de terapia imune antes do início dos sintomas (Papadakis *et al.*, 2001; Pfau *et al.*, 2001; Kishore *et al.*, 2004).

A infecção por CMV é a causa viral mais comum de diarreia em pacientes infectados pelo HIV; a atuação deste vírus no trato gastrintestinal pode ocorrer na forma localizada ou disseminada (Pollock & Farthing, 2000; Cohen, 2001; Helderman & Goral, 2002; Hebart & Einsele, 2004; Ginsburg & Thuluvath, 2005). Neste estudo, 22 das 37 amostras positivas para CMV, incluindo 3 infecções mistas com outros vírus, pertenciam a pacientes HIV-positivos. Destas 22 amostras de pacientes portadores de HIV e positivas para CMV, 15 eram provenientes de indivíduos com relação $TCD4^+/TCD8^+ < 1$. Portanto esses achados fortalecem e corroboram dados da literatura que relatam que a infecção pelo CMV, entre pacientes infectados pelo HIV, ocorre tipicamente quando a contagem de $TCD4^+$ está baixa (Lew *et al.*, 1997). Assim, há um aumento do número absoluto de células $TCD8^+$ circulantes e este torna-se maior que o número de células $TCD4^+$, devido a diminuição dessas últimas ou talvez a uma tentativa de controle da viremia pela imunidade celular, ocorrendo uma inversão da relação $TCD4^+/TCD8^+$, para <1 .

Nos pacientes com imunossupressão prolongada, induzidas pelo uso de medicações imunossupressoras, os casos de infecção pelo CMV já foram associados com episódios de agravamento do quadro, apresentando uma maior refratariedade ao tratamento medicamentoso, bem como uma evolução clínica

mais grave. Como exemplo desses pacientes podemos citar os pós-transplantados, tendo em vista a terapia imunossupressora a que estão submetidos (Komorowski *et al.*, 1986; Kishore *et al.*, 2004; Arslan *et al.*, 2007). No presente trabalho sete amostras positivas para CMV pertenciam a esse grupo de indivíduos, sendo cinco TxR e dois TMO. A infecção por CMV, geralmente, ocorre nos três primeiros meses pós-transplante, na maioria dos indivíduos transplantados, quando a imunossupressão é mais intensa (Patel & Paiva, 1997; Rowshani *et al.*, 2005). Neste estudo, embora não se possa afirmar que esses indivíduos estavam sendo tratados com terapia imunossupressora, quatro das cinco amostras positivas para CMV em transplantados TxR e as duas provindas de indivíduos TMO foram coletadas pouco tempo após o transplante, reforçando os dados da literatura supracitados. A infecção por CMV tem sido associada ao desenvolvimento de rejeição aguda ou crônica do transplante e com a diminuição da sobrevivência do paciente transplantado (Koskinen *et al.*, 1993; Cainelli & Vento, 2002). Deste modo, esta infecção permanece como a principal causa de morbidade e mortalidade após transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TPCH), sendo considerada ainda, em longo prazo, uma ameaça ao sucesso do TCPH (Boeckh *et al.*, 2003; Herbart & Einsele, 2004). Entre as sete amostras positivas para CMV neste grupo de indivíduos imunocomprometidos, constataram-se três óbitos: dois indivíduos submetidos a TxR recente e um indivíduo receptor de TMO, também recente.

Neste estudo, houve quatro ocorrências de casos positivos para HSV-1 e HSV-2, sendo dois casos de pacientes com AIDS e outros dois de pacientes

transplantados [um TxR e outro TMO]. Com relação aos dois casos positivos em pacientes aidéticos, é sabido que as infecções por HSV, juntamente com as por CMV são prevalentes nesta população (Thom & Forrest, 2006; Griffin *et al.*, 2008). A maioria desses indivíduos é coinfectada com um ou ambos os tipos de vírus HSV, sendo mais comum a evidência de recorrência do que infecção primária. Embora o HSV-1 seja responsável por lesões orolabiais e o HSV-2 por lesões genitais, os dois tipos podem causar infecção em qualquer sítio. A sintomatologia clássica pode manifestar-se, independentemente do estágio da doença pelo HIV. A reativação tende a ser mais freqüente, mais grave, e com maior duração. Além de causar grandes lesões orais ou genitais, a reativação deste vírus pode ocasionalmente afetar a garganta, o cólon e outros órgãos, incluindo o fígado, olhos e pulmões.

Os outros dois casos positivos para HSV se tratavam de indivíduos transplantados. Nos receptores de medula óssea, sabe-se que a maioria das complicações ocorre durante os quatro primeiros meses após o transplante, em razão de potenciais alterações em múltiplos órgãos, seja pela toxicidade do tratamento, por infecções, distúrbios imunológicos inerentes ao procedimento, alterações do sistema hematopoético ou pelo uso intensivo de múltiplos medicamentos. A maioria das infecções, durante o primeiro mês após o transplante, é relacionada às complicações cirúrgicas. A infecção viral comumente vista no pós-operatório precoce é a reativação de HSV, em indivíduos soropositivos para o vírus no pré-transplante (Miller & Dummer, 2007), como ocorrido neste estudo, já que ambos pacientes já haviam sido infectados pelo

HSV. A ocorrência de complicações entéricas associadas à infecção por HSV, tais como colite, jejunita e esofagite pós-transplantes, já foi descrita (Kingreen *et al.*, 1997; Helderman & Goral, 2002; Dray, 2006).

Três amostras foram positivas para AdV, todas elas provenientes de pacientes aidéticos que se encontravam hospitalizados, no momento da coleta. Esse dado está de acordo com outros estudos realizados, que demonstram a presença de AdV com uma prevalência maior em pacientes portadores de HIV do que em indivíduos transplantados (Hierholzer, 1992). A prevalência de casos positivos de AdV nas amostras de pacientes portadores de HIV foi de 3,4% (3/87), estando de acordo com estudos realizados por Kaljot *et al.* (1989), Janoff *et al.* (1991), Khoo *et al.* (1995) entre outros, onde a mesma varia de 0 a 29%.

Duas das três amostras AdV positivas foram originárias de pacientes co-infectados por CMV. Esta associação pode ser facilitada devido à influência de um ou outro vírus no estado geral do paciente, propiciando a manifestação/replicação do segundo. Os AdV estão entre os muitos patógenos que contribuem para debilitar e, muitas vezes causar doença fatal, em pacientes imunocomprometidos. Alguns autores consideram-no como o vírus mais freqüente em casos de diarreia em pacientes HIV positivos, depois do CMV (Trevino *et al.*, 2001). Podem ser excretados nas fezes, por semanas ou meses após a infecção inicial, permitindo a sua presença por longos períodos no trato gastrointestinal, possibilitando assim sua maior contribuição para o surgimento de doença no indivíduo imunocomprometido (Hierholzer, 1992; Sabin *et al.*, 1999).

As duas amostras positivas para HBoV pertenciam a pacientes com AIDS e que também apresentavam exame parasitológico positivo: um caso com presença de oocistos de *Isospora belli* e o outro com presença de larvas de *Strongyloides stercoralis*, dois patógenos conhecidamente relacionados a quadros de diarreia. Em uma das amostras, além da co-infecção com parasitos, houve também co-infecção viral (associação entre HBoV e CMV). Todavia, não se deve descartar a possível participação do HBoV no agravamento do quadro geral de gastroenterite, pois o mesmo encontrava-se, em ambos pacientes, com uma carga viral bastante elevada (uma amostra com detecção até a diluição de 10^{-3} e a outra 10^{-5}), sugerindo sua replicação no trato gastrointestinal desses pacientes. Reforçando essa hipótese temos o fato de no momento da coleta dessas amostras positivas para HBoV, os dois pacientes encontrarem-se hospitalizados e num estado crítico de imunocomprometimento, favorecendo o acometimento por vários patógenos oportunistas. No entanto, a pesquisa realizada para a detecção da eventual presença de bactérias, em uma das amostras [a de maior carga parasitária e sem coinfecção viral] apresentou resultado negativo, o que pode indicar, mais uma vez, que o HBoV teria uma participação na infecção entérica, mesmo como um coadjuvante, atuando de forma sinérgica.

Como observado nos trabalhos de Albuquerque *et al.*, 2007 e Vicente *et al.*, 2007, a presença de HBoV em amostras fecais de crianças com diarreia, apresentando ou não sintomas respiratórios, apóia a idéia do possível envolvimento desse vírus, além do seu papel como patógeno respiratório, na manifestação de sintomas entéricos. Entretanto, o papel do HBoV como patógeno

entérico, em indivíduos imunocompetentes ou imunocomprometidos ainda precisa ser esclarecido.

Não foi detectado nenhum caso de infecção entérica por vírus constituídos de genoma de RNA embora infecções por rotavírus, norovírus e astrovírus já tenham sido descritas para pacientes imunocomprometidos (Peigue & Lafeuille, 1991; Stewart *et al.*, 1995; Helderman & Goral, 2002; Kaufman *et al.*, 2003 e 2005; Gallimore *et al.*, 2004 e 2005; Stelzmuller *et al.*, 2005; Mattner *et al.*, 2006; Sebire *et al.*, 2004; Yee *et al.*, 2006; Stelzmuller *et al.*, 2007; Rossite *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008). Tais patógenos estão, possivelmente, mais relacionados a quadros de diarreia infantil (Rodriguez-Baez *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008).

Até o momento da análise dos dados, haviam ocorrido 24 óbitos dentre os 147 pacientes que forneceram amostras fecais para esse estudo. Metade desses pacientes apresentou pesquisa viral positiva. Devido ao grande número de variáveis envolvidas, torna-se difícil avaliar se a presença desses vírus foi fator relevante ou determinante para o óbito.

Entretanto, os resultados obtidos neste estudo, reforçam a necessidade do estabelecimento de diagnóstico laboratorial rotineiro, para pesquisa de patógenos virais em pacientes imunocomprometidos. Dentre as 150 amostras pesquisadas, 43 [28,7%] foram positivas para vírus e 27 positivas para parasitos [18%]. Embora tenha havido co-infecção por vírus e parasitos em 10 [6,7%] amostras, a ausência da pesquisa de vírus nesses pacientes teria resultado num diagnóstico impreciso e

incompleto, cujas conseqüências para os pacientes poderiam ser extremamente graves.

A existência de técnicas moleculares torna o diagnóstico das infecções virais mais preciso e exato. Este fato vem garantir a reprodutibilidade dos resultados, além de permitir elevada sensibilidade e especificidade, evitando a ocorrência dos falsos positivos ou falsos negativos e assim, conseqüentemente, trazendo vantagens para o diagnóstico tais como rapidez e melhor custo/benefício (Eschevarria *et al.*, 1999; Minosse *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2005; Logan, O'Leary, & O'Sullivan, 2006; Lu *et al.*, 2006; Royuela, Negro, & Sánchez-Fauquier, 2006; Trujillo *et al.*, 2006; Drew, 2007).

Neste trabalho, a reação em cadeia polimerase (PCR) além de ter sido utilizada para avaliação qualitativa, auxiliou como ferramenta para estimativa da carga viral em alguns casos, possibilitando assim seu uso semi-quantitativo e auxiliando na interpretação dos dados. Algumas técnicas convencionais, tais como de isolamento viral em cultura e detecção rápida por sorologia, por exemplo, esbarram em alguns obstáculos, como demora no diagnóstico ou imprecisão devido à baixa sensibilidade/especificidade.

A análise dos dados obtidos nessa pesquisa permite o estabelecimento de um algoritmo para diagnóstico laboratorial, visto que, com base nos resultados observados, é possível estabelecer prioridades para a pesquisa viral, em material fecal de pacientes imunocomprometidos. Neste caso, deve-se priorizar a

pesquisa de vírus de DNA, particularmente CMV, HSV e AdV, e possivelmente HBoV. Os vírus entéricos comuns na população em geral, tais como rotavírus, norovírus e astrovírus são observados em baixa frequência entre pacientes imunossuprimidos e, portanto, não precisariam ser pesquisados rotineiramente em todas as amostras, mas somente naquelas que não apresentarem resultado positivo para os vírus citados acima.

15. CONCLUSÕES

- ✓ As infecções virais entéricas são freqüentes em pacientes imunocomprometidos;
- ✓ A freqüência das infecções virais na população estudada foi significativamente mais elevada do que as infecções parasitárias;
- ✓ O CMV foi o patógeno viral encontrado com maior freqüência em pacientes imunocomprometidos, independente da causa da imunossupressão;
- ✓ A implementação de uma rotina de diagnóstico molecular, para detecção precisa e rápida de patógenos virais, contribuiria para um melhor prognóstico e recuperação de pacientes por ele acometidos;
- ✓ A rotina de testagem das amostras deve priorizar a pesquisa de vírus de DNA tais como CMV, HSV e AdV, por serem estes os mais comumente detectados em pacientes imunossuprimidos com quadros de diarreia.

16. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abid, I.; Guix, S.; Aouni, M.; Pintó, R. & Bosch, A. (2007). Detection and characterization of human group C rotavirus in the pediatric population of Barcelona, Spain. *J. Clin. Virol.* **38**:78–82.

Albuquerque, M. C. M.; Rocha, L. R.; Benati, F. B.; Soares, C. C.; Maranhão, A. G.; Ramírez, M. L.; Erdman, D. & Santos, N. (2007). Human Bocavirus Infection in Brazilian Children with Gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* **13**:1756-1758.

Allander, T.; Tammi, M. T.; Eriksson, M.; Bjerkne, A.; Tiveljung-Lindell, A. & Andersson, B. (2005). Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:12891–12896.

Allander, T.; Jarti, T.; Gupta, S.; Niesters, H. G. M.; Lehtinen, P.; Österback, R.; Vuorinen, T.; Waris, M.; Bjerkner, A.; Tiveljung-Lindell, A.; van den Hoogen, B.; Hyypiä, T. & Ruuskanen, O. (2007). Human bocavirus and acute wheezing in children. *J. Infect. Dis.* **44**:904-910.

Allander, T. (2008). Human bocavirus. *J. Clin. Virol.*, **41**:29-33.

Allard, A.; Albinsson B. & Wadell, G. (2001). Rapid typing of adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **39**:498-505.

Amenábar, J. J.; Durán, M. I.; Montejo, M. & Lampreabe, I. (2006). Encefalitis por virus herpes simple en paciente portadora de trasplante renal. Estudio de un caso y revisión de la literatura. *Nefrología* **26**:270-273.

Anderson, E. J. & Weber, S. G. (2004). Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect. Dis.* **4**:91–99

Ando, T., Noel, J. S. & Fankhauser, R. L. (2000). Genetic classification of Norwalk-like viruses. *J. Infect. Dis.*, **181** [Suppl 2]:S336-S348.

Arnold, J. C.; Singh, K. K.; Spector, S. A. & Sawyer, M. H. (2006). Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a Children's Hospital. *Clin. Infect. Dis.* **43**:283-288.

Arslan, H.; Inc, E. K.; Azap, O. K.; Karakayali, H.; Torgay, A. & Haberal, M. (2007). Etiologic agents of diarrhea in solid organ recipients. *Transpl. Infect. Dis.* **9**:270-275.

Atmar, R. L. & Estes, M. K. (2001). Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the Human Caliciviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:15-37.

Atmar, R. L. & Estes, M. K. (2002). Norwalk virus and related caliciviruses causing gastroenteritis. *In*: D. D. Richman; R. J. Whitley & F. Hayden (ed.). *Clinical Virology*, 2nd ed. ASM Press, Washigton D.C.

Bailly, J. L. ; Chambon, M.; Henquell, C. ; Icart, J. & Peigue-Lafeuille, H. (2000). Genomic variations in echovirus 30 persistent isolates recovered from a chronically infected immunodeficient child and comparison with the reference strain. *J. Clin. Microbiol.* **38**:552-557.

Baldwin, A.; Kingman, H.; Darville, M.; Foot, A. B. M.; Grier, D.; Cornish, J. M.; Goulden, N.; Oakhill, A.; Pamphilon, D. H.; Steward, C. G. & Marks, D. I. (2000). Outcome and clinical course of 100 patients with adenovirus infection following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **26**:1333–1338.

Bányai, K.; Jiang, B.; Bogdán, Á.; Horváth, B.; Jakab, F.; Meleg, E.; Martella, V.; Magyari, L.; Meleg, B. & Szúcs, G. (2006). Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J. Clin. Virol.* **37**:317–322.

Barman, P.; Ghosha, S.; Samajdar, S.; Mitra, U.; Dutta, P.; Bhattacharya, S. K.; Krishnan, T.; Kobayashi, N. & Naik, T. N. (2006). RT-PCR based diagnosis revealed importance of human group B rotavirus infection in childhood diarrhea. *J. Clin. Virol.* **36**:222–227.

Beaulieu, B. L. & Sullivan, J. (1997). Epstein-Barr virus. P. 485-507. *In*: D. D. Richman, R. J. Whitcey, F. G. Hayden (eds.). *Clinical Virology*, 1st ed. Churchill Livingstone Inc., New York.

Belliot, G., Laveran, H. & Monroe, S. S. (1997). Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch. Virol.* **142**:1323-1334.

Boeckh, M.; Nichols, W. G.; Papanicolaou, G.; Rubin, R.; Wingard, J. R.; Zaia, J. (2003). Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: current status, known challenges, and future strategies. *Biol. Blood Marr. Transpl.* **9**:543-558.

Bridges, ND.; Spary, T. L.; Collins, M. H.; Bowles, N. E.; Towbin, J. A. (1998). Adenovirus infections in the lung results in graft failure after lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **116**:617-623.

Bull, R.; Hansman, G.; Clancy, L.; Tanaka, M.; Rawlinson, W. & White, P. (2005). Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Em. Infect. Dis.*, **11**:1079-1085.

Cainelli, F. & Vento, S. (2002). Infections and solid organ transplant rejection: a cause-and-effect relationship? *Lancet Infect. Dis.* **2**:539-549.

CDC. (2002). Outbreaks of gastroenteritis associated with noroviruses on cruise ships - United States, 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. **51**:1112-1115.

CDC. (2003). Norovirus activity – United States, 2002. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). **52**:41-45.

Chui, D. W. & Owen, R. L. (1994). AIDS and the gut. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **9**:291-303.

Cohen, J. I. (2000). Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* **343**: 481-492.

Cohen, J. (2001). Infectious diarrhea in human immunodeficiency virus. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* **30**:637-64.

Cohen, J. M.; Cooper, N.; Chakrabarti, S.; Thomson, K.; Samarasinghe, S., Cubitt, D.; Lloyd, C.; Woolfrey, A.; Veys, P. & Amrolia, P. J. (2007). EBV-related disease following haematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning. *Luek. Lymphoma*, **48**:256-269.

Cox, G. J.; Matsui, S. M. ; Lo, R. S. ; Hinds, M.; Bowden, R. A.; Hackman, R. C.; Meyer, W. G.; Mori, M. ; Tarr, P. I. & Oshiro, L. S. (1994). Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. *Gastroenterology* **107**:1398-1407.

Cubitt, W. D.; Mitchell, D. K.; Carter, M. J.; Willcocks, M. M. & Holzel, H. (1999). Application of electron microscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. *J. Med. Virol.* **57**:313-321.

Cunliffe, N. A.; Dove, W.; Gondwe, J. S.; Thindwa, B. D. M.; Greensill, J.; Holmes, J. L.; Bresee, J. S.; Monroe, S. S.; Glass, R. I.; Broadhead, R. L.; Molyneux, M. E. & Hart, C. A. (2002). Detection and characterisation of human astroviruses in children with acute astroenteritis in Blantyre, Malawi. *J. Med. Virol.* **67**:563–566.

Dalton, R. M.; Roman, E. R.; Negredo, A. A.; Wilhelmi, I. D.; Glass, R. I. & Sánchez-Fauquier, A. (2002). Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **21**:1038-1041.

Davison, A. J.; Benkő, M. & Harrach, B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J. Gen. Virol.* **84**:2895-2908.

de Jong, J. C.; Wermenbol, A. G.; Verweij-Uijterwaal, M. W.; Slaterus, K. W.; Wertheim-Van Dillen, P.; Van Doornum, G. J. J.; Khoo, S. H. & Hierholzer, J. C. (1999). Adenovirus from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Adv 50 and Adv 51 of species B1 and D, respectively. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3940-3945.

Dray, X.; Tretona, X.; Mazonb, M. C.; Lavergne-Slovec, A. ; Jolya, F.; Mimramd, D.; Attare, A.; Tobelemf, G. & Bouhnika, Y. (2006). Herpes simplex virus type 1 colitis in a patient with common variable immunodeficiency syndrome. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**:541-544.

Drew, W. L. (2007). Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis* **20**:408-411.

Eschavarria, M. S.; Ray, S. C.; Ambinder, R.; Dumler, J. S. & Charache, P. (1999). PCR detection of adenovirus in a bone marrow transplant recipient: hemorrhagic cystitis as a presenting manifestation of disseminated disease. *J. Clin. Microbiol.* **37**:686-689.

Estes, M.K., & Kapikian, A. Z. (2007). Rotaviruses. p. 1917-1974. *In*: Knipe D.M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). *Fields Virology*, 5th ed, vol 2,. Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.

Feeney, S.A.; Mitchell, S. J.; Mitchell, F.; Wyatt, D. E.; Fairley, D.; McCaughey, C.; Coyle, P. V. & O' Neill, H. J. (2006). Association of the G4 rotavirus genotype with gastroenteritis in adults. *J. Med. Virol.* **78**:1119-1123.

Fitts, S. W.; Green, M.; Reyes, J.; Nour, B.; Tzakis, A. G. & Kocoshi, S. A. (1995). Clinical features of nosocomial rotavirus infection in pediatric liver transplant recipients. *Clin. Transplant.* **9**:201-204.

Forrest, G. (2004). Gastrointestinal infections in immunocompromised hosts. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **20**:16-21.

Fry, A. M.; Lu, X.; Chittaganpitch, M.; Peret, T.; Fischer, J.; Dowell, S. F.; Anderson, L. J.; Erdman, D. & Olsen, S. J. (2007). Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J. Infect. Dis.* **195**:1038–45.

Gallimore, C. I.; Lewis, D.; Taylor, C.; Cant, A.; Gennery, A. & Grey, J. J. (2004). Chronic excretion of a norovirus in a child with cartilage hair hypoplasia (CHH). *J. Clin. Virol.* **30**:196-204.

Gallimore, C. I.; Taylor, C.; Gennery, A. R.; Cant, A. J.; Galloway, A.; Lewis, D. & Gray, J. J. (2005). Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J. Clin. Microbiol.* **43**:3890-3894.

Garbino, J.; Inoubli, S.; Mossdorf, E.; Weber, R.; Tamm, M.; Soccac, P.; Aubert, J. D.; Bridevaux, P. O.; Tapparel, C.; Kaiser, L & The Swiss HIV Cohort Study.

(2008). Respiratory viruses in HIV-infected patients with suspected respiratory opportunistic infection. *AIDS* **30**:701-705.

Gilger, M. A.; Matson, D. O.; Conner, M. E.; Rosenblatt, H. M.; Finegold, M. J.; Estes, M. K. (1992). Extraintestinal rotavirus infection in children with immunodeficiency. *J. Pediatr.* **120**:912-920.

Ginsburg, P. M. & Thuluvath, P. J. (2005). Diarrhea in liver transplant recipients: etiology and management. *Liver Transpl.* **11**:881-890.

Giordano, M. O.; Martinez, L. C.; Rinaldi, D.; Espul, C.; Martinez, N.; Isa, M. B.; Depetris, A. R.; Medeot, S. I. & Nates, S. V. (1999). Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. *AIDS Res. Hum. Retrovirol.* **15**:1427-1432.

Giordano, M. O.; Ferreyra, L. J.; Isa, M. B.; Martinez, L. C.; Yudowsky, S. I. & Nates, S. V. (2001). The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children in Cordoba City, Argentina: an insight of disease burden. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **43**:193-197.

González, G. G.; Pujol, F. H.; Liprandi, F.; Deibis, L. & Ludert, J. E. (1998). Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. *J. Med. Virol.* **55**:288–292

Gouvea, V.; Allen, J. R.; Glass, R. I.; Fang, Z.-Y.; Bremont, M.; Cohen, J.; McCrae, M. A.; Saif, L. J.; Sinarachant, J. & Caule, E. O. (1991). Detection of Group B and C Rotaviruses by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**:519-523.

Green, K. Y. (2007). *Caliciviridae: The Noroviruses*. p. 949-979. *In*: Knipe D.M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). *Fields Virology*, 5th ed, vol 2,. Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.

Griffin, E.; Krantz, E.; Selke, S.; Huang, M. L. & Wald, A. (2008). Oral mucosal reactivation rates of herpesviruses among HIV-1 seropositive persons. *J. Med. Virol.* **80**(7): 1153-1159.

Grohmann, G. S.; Glass, R. I.; Pereira, H. G.; Monroe, S. S.; Hightower, A. W.; Weber, R. & Bryan, R. T. (1993). Enteric viruses and diarrhea in HIV- infected patients. *N. Engl. J. Med.* **329**:14-20.

Guix, S; Caballero, S.; Villena, C.; Bartolomé, R.; Latorre, C.; Rabella, N.; Simó, M.; Bosh, A. & Pintó, R. M. (2002). Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J. Clin. Microbiol.* **40**:133-139.

Hale, G. A.; Heslop H. E.; Krance R. A.; Brenner M. A.; Jayawardene D.; Srivastava D. K. & Patrick C. C. (1999). Adenovirus infections after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **23**:277-282.

Hebart, H. & Einsele, H. (2004). Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum. Immunol.* **65**:432-436.

Heininger, A.; Vogel, U.; Aepinus, C. & Hamprecht, K. (2000). Disseminated fatal human cytomegalovirus disease after severe trauma. *Crit. Care Med.* **28**:563-566.

Helderman, J. H. (2001). Prophylaxis and treatment of gastrointestinal complications following transplantation. *Clin. Transplant.* **4**:29-35.

Helderman, J. H. & Goral, S. (2002). Gastrointestinal complications of transplant immunosuppression. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**:277-287.

Hierholzer, J. C. (1992). Adenovirus in immunocompromised host. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**:262-274.

Howard, D. S.; Phillips II G. L.; Reece D. E.; Munn R. K.; Henslee-Downey J.; Pittard M.; Barker M. & Pomeroy C. (1999). Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* **29**:1494-1501.

Humar, A.; Kumar, D.; Mazzulli, T.; Razonable, R. R.; Moussa, G.; Paya, C. V.; Covington, E.; Alecock, E.; Pescovitz, M. D. & PV 16000 Study Group. (2005). A surveillance of adenovirus infections in adult organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **5**:2555-2559.

Iizuka, S.; Tabara, K.; Kawamukai, A.; Itogawa, H. & Hoshina, K. (2006). An outbreak of group C rotavirus infection in an elementary school in Shimane Prefecture, Japan, February 2006. *Jpn. J. Infect. Dis.* **59**:350-351.

Ison, M. G. (2006). Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* **43**:331-339.

Iturriza-Gomara, M.; Wong, C.; Blome, S.; Desselberger, U. & Gray, J. (2002). Rotavirus subgroup characterization by restriction endonuclease digestion of a cDNA fragment of the VP6. *J. Virol. Meth.* **105**:99-103.

Janoff, E. N.; Orentin, J. M.; Manischewitz, J. F. & Smith, P. D. (1991). Adenovirus colitis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology* **100**:976-979.

Kageyama, T.; Shinohara, M.; Uchida, K.; Fukushi, S.; Hoshino, F.; Kojima, S.; Takai, R.; Oka, T.; Takeda, N. & Katayama, K. (2004). Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **42**:2988-2995.

Kajaoghlamian, T.; Flomberg P. & Horwitz M. S. (2003). The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev. Med. Virol.* **13**:155-171.

Kaljot, K. T.; Ling, J. P.; Gold, J. W.; Laughan, B. E.; Bartlett, J. G.; Kotler, D. P.; Oshiro, L. S. & Greenberg, H. B. (1989). Prevalence of acute enteric viral pathogens in acquired immunodeficiency syndrome patients with diarrhea. *Gastroenterology* **97**:1031-1032.

Kamboj, M.; Mihu, C. N.; Sepkowitz, K.; Kernan, N. A. & Papanicolau, G. A. (2007). Work-up for infectious diarrhea after allogenic hematopoietic stem cell transplantation: single specimen testing results in cost savings without compromising diagnostic yield. *Transpl. Infect. Dis.* **9**:265-269.

Kang, G.; Srivastava, A.; Pulimood, A. B.; Dennison, D. & Chandy, M. (2002). Etiology of diarrhea in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation in South India. *Transplantation* **73**:1247–1251.

Karst, S.; Wobus, C.; Lay, M.; Davidson, J.; Virgin IV, H. (2003). STAT-1 dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* **299**:1575-1578.

Katayama, K.; Shirato-Horikoshi, H.; Kojima, S.; Kageyama, T.; Oka, T.; Hoshino, F.; Fukushi, S.; Shinohara, M.; Uchida, K.; Suzuki, Y.; Gojobori, T. & Takeda, N. (2002). Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology*, **299**:225-239.

Kaufman, S. S.; Chatterjee, N. K.; Fuschino, M. E.; Magid, M. S.; Gondond, R. E.; Morsec, D. L. Herold, B. C.; LeLeikob, N. S.; Tscherniab, A.; Florman, S. S.; Gondolesia, G. E. & Fishbein, T. M.. (2003). Calicivirus enteritis in an intestinal transplant recipient. *Am. J. Transplant.* **3**:764–768.

Kaufman, S. S.; Chatterjee, N. K.; Fuschino, M. E.; Morse, D. L.; Morotti, R. A.; Magid, M. S.; Gondolesi, G. E.; Florman, S. S. & Fishbein, T. M. (2005). Characteristics of human calicivirus enteritis in intestinal transplant recipients. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **40**:328-333.

Kesebir, D.; Vazquez, M.; Weibel, C.; Shapiro, E. D.; Ferguson, D.; Landry, M. L. & Kahn, J. S. (2006). Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J. Infect. Dis.* **194**:1276–82.

Khoo, S. H.; Bailey, A. S.; de Jong, J. C. & Mandal, B. K. (1995). Adenovirus infections in human immunodeficiency virus-positive patients: clinical features and molecular epidemiology. *J. Infect. Dis.* **172**: 629-637.

Kieff, E. & Rickinson, A. B. (2007). Epstein-Barr Virus, p.2603-2700. *In*: Knipe D.M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). *Fields Virology*, 5th ed, vol 2,. Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.

Kim, Y. J.; Boeckh, M. & Englund, J. A. (2007). Community respiratory virus infections in immunocompromised patients: hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients, and individuals with human immunodeficiency virus infection. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **28**:222-242.

Kingreen, D.; Nitsche, A.; Beyer, J. & Siegert, W. (1997). Herpes simplex infection of the jejunum occurring in the early post-transplantation period. *Bone Marrow Transplant.* **20**:989-991.

Kishore, J.; Ghoshal. U.; Ghoshal, U. C.; Krishnani, N.; Kumar, S.; Singh, M. & Ayyagari, A. (2004). Infection with cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease: prevalence, clinical significance and outcome. *J. Med. Microbiol.* **53**:1155-1160.

Komorowski, R. A.; Cohen, E. B.; Kauffman, M. & Adams, M. B. (1986). Gastrointestinal complications in renal transplant recipients. *Am. J. Clin. Pathol.* **86**:161–167.

Koskenvuo, M.; Möttönen, M.; Waris, M.; Allander, T.; Salmi, T. T. & Ruuskanen, O. (2007). Human bocavirus in children with acute lymphoblastic leukemia. *Eur. J. Pediatr.* Epub ahead of print in Nov. 24, 2007. DOI 10.1007/s00431-007-0631-8.

Koskinen, P. K.; Nieminen, M. S.; Krogerus, L. A.; Lemström, K. B.; Mattila, S. P.; Häyry, P. J. & Lautenschlager, I. T. (1993). Cytomegalovirus infection and accelerated cardiac allograft vasculopathy in human cardiac allografts. *J. Heart Lung Transplant.* **12**:724-729.

La Rosa, A.M.; Champlin, E.; Mirza, N.; Gajewski, J.; Giralt, S.; Rolston, K. V.; Raad, I.; Jacobson, K.; Kontoyiannis, D.; Elting, L. & Whimhey, E. (2001). Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clin. Infect. Dis.* **32**:871-876.

Lau, S. K.; Yip, C. C.; Que, T. L.; Lee, R. A.; Au-Yeung, R. K.; Zhou, B.; So, L. Y.; Chan, K. H.; Woo, P. C. & Yuen, K. Y. (2007). Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. *J. Infect. Dis.* **196**:986-993.

Lee, J. I.; Chung, J. Y.; Han, T. H.; Song, M. O. & Hwang, E. S. (2007). Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* **196**:994-997.

Lee, B. E.; Pang, X. L.; Robinson, J. L.; Bigan, D.; Monroe, S. S. & Preiksaitis, J. K. (2008). Chronic norovirus and adenovirus in a solid organ transplant recipient. *Ped. Infect. Dis. J.* **27**:1-3.

Leen, A. M. & Rooney, C. M. (2004). Adenovirus as an emergent pathogen in immunocompromised patients. *Br. J. Haematol.* **128**:135-144.

Lew, E. A.; Poles, M. A. & Dieterich, D. T. (1997). Diarrheal diseases associated with HIV infection. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* **26**:259–290.

Lewthwaite, P.; Gill, V. G.; Hart, C. A. & Beeching, N. J. (2005). Gastrointestinal parasites in the immunocompromised. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**:427-435.

Liakopoulou, E.; Mutton, K.; Carrington, D.; Robinson, S.; Steward, C. G.; Goulden, N. J.; Cornish, J. M. & Marks, D. I. (2005). Rotavirus as a significant cause of prolonged diarrhoeal illness and morbidity following allogenic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **36**:691-694.

Liste, M. B.; Natera, I.; Suarez, J. A.; Pujol, F. H.; Liprandi, F. & Ludert, J. E. (2000). Enteric virus infections and diarrhea in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2873-2877.

Ljungman, P. (2007). Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Viral status. *Best Pract Res Clin Haematol.* **20**:209-217.

Logan, C.; O'Leary, J. J. & O'Sullivan, N. (2006). Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3189-3195.

Lopman, B. A.; Adak, G. K.; Reacher, M & Brown, D. (2003). Two epidemiologic patterns of *norovirus* outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:71-77.

Losonsky, G. A.; Johnson, J. P.; Winkelstein, J. A. & Yolken, R. H. (1985). Oral administration of human serum immunoglobulin in immunodeficient patients with viral gastroenteritis. *J. Clin. Invest.* **76**:2362-2367.

Lu, X.; Chittaganpitch, M.; Olsen, S. J.; Mackay, I. M.; Sloots, T. P.; Fry, A. M. & Erdman, D. D. (2006). Real-time pcr assays for detection of bocavirus in human specimens. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3231-3235.

Maiorana, A.; Baccarini, P.; Foroni, M.; Bellini, N. & Giusti, F. (2003). Human Cytomegalovirus infection of the gastrointestinal tract in apparently immunocompetent patients. *Hum. Pathol.* **34**:1331-1336.

Mattner, F.; Sohr, D.; Heim, A.; Gastmeier, P.; Vennema, H. & Koopmans, M. (2006). Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak Investigation. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:69–74.

Matson, D.; O’Ryan, M.; Jiang, X. & Mitchell, D. (2000). Rotavirus, enteric adenoviruses, caliciviruses, astroviruses, and other viruses causing gastroenteritis, p. 270-294. *In*: Specter, S.; Hodinka, R. & Young, S. (ed.), *Clinical Virology Manual 3rd ed.*, ASM Press, Washington D.C.

Matsui, S. M. (2002). Astrovirus, p. 1075-1986. *In*: D. D. Richman; R. J. Whitley & F. Hayden (ed.). *Clinical Virology, 2nd ed.* ASM Press, Washigton D.C.

McIntosh, K. (2006). Human Bocavirus: developing evidence for pathogenicity. *J. Infect. Dis.* **194**:1197- 1199.

Méndez, E. & Arias, C. F. (2007). Astroviruses. p.981-1000. *In*: Knipe D.M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). *Fields Virology, 5th ed, vol 2.*, Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.

Mezerville, M. H.; Tellier R.; Richardson S.; Hébert D.; Doyle J. & Allen U. (2006). Adenoviral infections in pediatric transplant recipients a hospital-based study. *Pediatr Infect Dis J.* **25**:815-818.

Miller, G. G. & Dummer, J. S. (2007). Herpes Simplex and Varicella Zoster Viruses: Forgotten but not gone. *Am. J. Transplant.* **7**:741–747.

Minosse, C., Zaniratti, M. S.; Calcaterra, S.; Carletti, F.; Muscillo, M.; Pisciotta, M.; Pillitteri, L.; Corpolongo, A.; Lauria, F. N.; Narciso, P.; Anzidei, G.; & Capobianchi, M. R. (2005) Application of a molecular panel to demonstrate enterotropic virus shedding by healthy and human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Clin. Microbiol.* **43**:1979-1981.

Mitchell, D. K. (2002). Astroviruses gastroenteritis. *Conc. Rev. Ped. Infect. Dis.* **21**:1067-1070.

Mocarski, Jr. E. S.; Shenk, T. & Pass, R. F. (2007). Cytomegaloviruses, p. 2701-2772. *In*: Knipe D.M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). *Fields Virology*, 5th ed, vol 2,. Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.

Morotti, R. A.; Kaufman, S. S. Fishbein, T. M. ; Chatterjee, N. K. ; Fuschino, M. E. ; Morse, D. L. & Madig, M. (2004). Calicivirus infection in pediatric small intestine transplant recipients: pathological considerations. *Hum. Pathol.* **35**:1236-1240.

Munoz, F. M.; Piedra, P. A. & Demmier, G. J. (1998). Disseminated adenovirus disease in immunocompromised and immunocompetent children. *Clin. Infect. Dis.* **27**:1194-1200.

Mura, M. S.; Mannazzu, M.; Calia, G. M.; Porcu, P.; Panichi, G. & Aceti, A. (1996). Rotavirus infection in AIDS-associated diarrhoea. *J. Infect.* **33**:66-67.

Neske, F.; Blessing, K.; Tollmann, F.; Schubert, J.; Rethwilm, A.; Kreth, H. W. & Weissbrich, B. (2007). Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2116-2122.

Noel, J., Lee, T. W., Kurtz, J. B. & Glass, R. I. (1995). Typing of human astroviruses from clinical isolates by immunoassay and nucleotide sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:797-801.

Papadakis, K. A.; Tung, J. K.; Binder, S. W.; Kam, L. Y.; Abreu, M. T. & Targan, S. R. (2001). Outcome of cytomegalovirus infections in patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **96**:2137-42.

Parashar, U. D.; Gibson, C. J.; Bresee, J. S. & Glass, R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:304-306.

Patel, R. & Paiva, C. V. (1997). Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin. Infect. Rev.* **10**:86–124.

Peigue-Lafeuille, H.; Henquell, C.; chambom, M. ; Gazuy, N. ; De Champs, C. & Cluzel, R. (1991). Nosocomial rotavirus infections in adult renal transplant recipients. *J. Hosp. Infect.* **18**:67-70.

Pfau, P.; Kochman, M.; Furth, E. & Lichtenstein, G. R. (2001). Cytomegalovirus colitis complicating ulcerative colitis in the steroid-naïve patient. *Am. J. Gastroenterol.* **96**:895–899.

Pierre, R.; Steel, D. J. C.; Evans, G. T.; Rodriguez, B.; Palmer, P.; Smikle, M. F.; Whorms, S.; Hambleton, I.; Figueroa, J. P. & Christie, C. D. (2004). CDC-defined diseases and opportunistic infections in Jamaican children with HIV/AIDS. *West Indian Med. J.* **53**:315-321.

Pinchoff, R. J.; Kaufman, S. S.; Magid, M. S.; Erdman, D. D.; Gondolesi, G. E.; Mendelson, M. H.; Tane, K.; & Jenkins, S. G.; Fishbein, T. M. & Herold, B. C. (2003). Adenovirus infection in pediatric small bowel transplantation recipients. *Transplantation* **76**:83–189.

Pollok, R. C. G. & Farthing, M. J. G. (2000). Enteric viruses in HIV-related diarrhea. *Mol. Meth. Today* **6**:483-487.

Ponticelli, C. & Passerini, P. (2005). Gastrointestinal complications in renal transplant recipients. *Transpl. Int.* **18**:643–650.

Ramos-Soriano, A. G.; Saavedra, J. M.; Wu, T.-C.; Livingston, R. A.; Henderson, R. A.; Perman, J. A. & Yolken, R. H. (1996). Enteric pathogens associated with gastrointestinal dysfunction in children with HIV infection. *Mol. Cell. Probes.* **10**:67-73.

Robin, M.; Marque-Juillet, S.; Scieux, C.; de Latour, R. P.; Ferry, C.; Rocha, V.; Molina, J. M.; Bergeron, A.; Devergie, A.; Gluckman, E.; Ribaud, P.; Socié, G. (2007). Disseminated adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factor and outcome. *Haematologica* **92**:1258-1261.

Rodriguez-Baez, N.; O'Brien, R.; Qiu, S. Q. & Bass, D. M. (2002). Astrovirus, adenovirus and rotavirus in hospitalized children: prevalence and association with gastroenteritis. *J. Ped. Gast. Nut.* **35**:64-68.

Rodríguez-Guillén, L.; Vizzi, E.; Alcalá, A. C.; Pujol, F. H.; Liprandi, F. & Ludert, J. E. (2005). Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *J. Clin. Virol.* **33**:104-109.

Roitt, I. M. & Delves, P. J.(2004). Imunodeficiências, p. 311- 327. *In*: I. M. Roitt & P. J. Delves (eds). *Fundamentos de Imunologia*. 10th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ.

Roizman, B. Knipe, D. M. & Whitley, R. J. (2007). Herpes Simplex, p. 2501-2601. *In*: Knipe D.M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). *Fields Virology*, 5th ed, vol 2,. Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.

Rossite, A. R. B.; Almeida, M. T. G.; Nogueira, C. A. M.; Oliveira, J. G. C.; Barbosa, D. U.; Moscardini, A. C.; Mascarenhas, J. D. P.; Gabbay, Y. B.; Marques, F. R.; Cardoso, L. V.; Cavasini, C. E. & Machado, R. L. D. (2007). Bacterial, yeast, parasitic, and viral enteropathogens in HIV-infected children from São Paulo state, southeastern Brazil. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **57**:59-66.

Royuela, E.; Negrodo, A. & Sánchez-Fauquier, A. (2006). Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. *J. Virol. Met.* **133**:14-19.

Rowshani, A. T.; Bemelman, F. J.; van Leeuwen, E. M. M.; van Lier, R. A. W. & ten Berge, I. J. M. (2005). Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* **79**:381-386.

Rubin, R. H. (2001). Gastrointestinal infectious disease complications following transplantation and their differentiation from immunosuppressant-induced gastrointestinal toxicities. *Clin. Transplant.* **15**[Suppl 4]:11-22.

Sabin, C. A.; Clewley, G. S.; Deayton, J. R.; Mocroft, A.; Johnson, M. A.; Lee, C. A.; Mc Laughlin, J. E. & Griffiths, P. D. (1999). Shorter survival in HIV-positive patients with diarrhoea who excrete adenovirus from the GI tract. *J. Med. Virol.* **58**:280-285.

Santos, N.; Clark, H F.; Hoshino, Y. & Gouvea, V. (1998). Relationship among serotype G3P5A rotavirus strains isolated from different host species. *Mol. Cell. Probes* **12**:379–386.

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

Saulsbury, F. T.; Winkelstein, J. A. & Yolken, R. H. (1980). Chronic rotavirus infection in immunodeficiency. *J. Pediatr.* **97**:61-65.

Sebire, N. J.; Malone, M.; Shah, N; Anderson, G.; Gaspar, H. B. & Cubitt, W. D. (2004). Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. *J. Clin. Pathol.* **57**:1001-1003.

Serraino, D.; Piselli, P.; Angeletti, C.; Scuderi, M.,& Ippolito, G. & Capobianchi, M. R. (2005). Infectin with Epstein-Barr virus and cancer: an epidemiological review. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* **19**:63-70.

Sestak, K. (2005). Chronic diarrhea and AIDS: insights into studies with non-primates. *Curr. HIV Res.* **3**:199-205.

Shirali, G. S.; Ni, J.; Chinnock, R. E.; Johnston, J. K.; Rosenthal, G. L.; Bowles, N. E. & Towbin, J. A. (2001). Association of viral genomes with graft loss in children after cardiac transplantation. *N. Engl. J. Med.* **344**:1498-1503.

Slouts, T. P.; McErlean, P.; Speicher, D. J.; Arden, K.; Nissen, M. D. & Mackay, I. A. (2006). Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J. Clin. Virol.* **35**:99-102.

Steininger, C.; Puchhammer-Stöck, E & Popow-Kraupp, T. (2006). Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J. Clin. Virol.* **37**:1–9.

Stelzmueller, I.; Dunst, K. M.; Hengster, P.; Wykypiel, H.; Steurer, W.; Wiesmayr, S.; Margreiter, R. & Bonatti, H. (2005). A cluster of rotavirus enteritis in adult transplant recipients. *Transpl. Inter.* **18**:470–474.

Stelzmueller, I.; Wiesmayr, S.; Swenson, B. R.; Biebl, M.; Goegele, H.; Margreiter, R. & Bonatti, H. (2007). Rotavirus enteritis in solid organ transplant recipients: an underestimated problem? *Transpl. Infect. Dis.* **9**:281-285.

Stewart, J. A.; Reef, S. E. & Pellett, P. E. (1995). Herpesvirus infection in persons with human immuno-deficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **21**:114-120.

Steyer, A.; Poljsak-Prijatelj, M.; Bufon, T.; Sedmak, M.; Vidmar, L.; Mijovski, J. Z. & Marin, J. (2006). First detection of group C rotavirus in patients with gastroenteritis in Slovenia. *J. Med. Virol.* **78**:1250–1255.

Swearingen, J. A. & Ailor, S. K. (2007). Herpes Simplex Virus: It's More than a Cold Sore. *Mo. Med.* **104**:144-148.

Tafreshi, N. K.; Sadeghizadeha, M.; Amini-Bavil-Olyaeab, S.; Ahadia, A. M.; Jahanzad, I. & Roostae, M. H. (2005). Development of a multiplex nested consensus PCR for detection and identification of major human herpesviruses in CNS infections. *J. Clin. Virol.* **32**:318–324.

Tashiro, Y.; Goto, M.; Takemoto, Y.; Sato, E.; Shirahama, H.; Utsunomiya, A.; Eizuru, Y. & Yonezawa, S. (2006). Epstein-Barr virus-associated enteritis with multiple ulcers after stem cell transplantation: First histologically confirmed case. *Pathology International* **56**:530-537.

Thom, K. & Forrest, G. (2006). Gastrointestinal infections in immunocompromised hosts. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **22**:18-23.

Thomas, P. D.; Pollok, R. C. G. & Gazzard, B. G. (1999). Enteric viral infections as a cause of diarrhea in the acquired immunodeficiency syndrome. *HIV Medicine.* **1**:19-24.

Treviño, M.; Prieto, E.; Peñalver, D.; Aguilera, A.; Garcia-Zabarte, A.; Garcia-Riestra, C. & Regueiro, B. J. (2001). Diarrea por adenovirus y astrovirus en pacientes inmunodeficientes hospitalizados. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **19**:7-10.

Trujillo, A. A.; McCaustland, K. A.; Zheng, D. P.; Hadley, L. A.; Vaughn, G.; Adams, S.; Ando, T.; Glass, R. I. & Monroe, S. S. (2006) Use of taqman real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* **44**:1405-1412.

Vicente, D.; Cilla, G.; Montes, M.; Pérez-Yarza, E. G. & Pérez-Trallero, E. (2007). Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg. Infect. Dis.* **13**:636-637.

Vinje, J.; Hamdjaja, R. & Sobsey, M. (2004). Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J. Virol. Meth.* **116**:109-117.

Wade, J. C. (2006). Viral infections in patients with hematological malignancies. *Hematology Am Soc. Hematol. Educ. Program*, 368-374.

Wang, J.; Ozzard, A.; Nathan, M.; Atkins, M.; Nelson, M.; Gazzard, B. & Bower, M. (2007). The significance of Epstein-Barr virus detected in the cerebrospinal fluid of people with HIV infection. *HIV Medicine.* **8**:306-311.

Wasselle J. A., Sedgwick, J. H. ; Dawson, P. J. & Fabri, P. J. (1992). Intestinal herpes simplex infection presenting with intestinal perforation. *Am. J. Gastroenterol.* **87**:1475-1477.

Watanabe, M.; Kohdera, U.; Kino, M.; Haruta, T.; Nukuzuma, S.; Suga, T.; Akiyoshi, K.; Ito, M.; Suga, S. & Komada, Y. (2005). Detection of adenovirus DNA in clinical samples by SYBR Green real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatr. Int.* **47**:286-291.

Weber, R.; Ledergerber, B.; Zbinden, R.; Altwegg, M.; Pfyffer, G. E.; Spycher, M. A.; Briner, J.; Kaiser, L.; Opravil, M.; Meyenberger, C. & Flepp, M. (1999). Enteric infections and diarrhea in human immunodeficiency virus-infected persons. *Arch. Intern. Med.* **159**:1473-1480.

Wold, W. S. M. & Horwitz, M. S. (2007). Adenoviruses. p.2395 – 2436. *In*: Knipe D.M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). *Fields Virology*, 5th ed, vol 2,. Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.

Wood, D. J.; David, T. J.; Chrystie, I. L. & Totterdell, B. (1988). Chronic enteric virus infection in two T-cell immunodeficient children. *J. Med. Virol.* **24**:435-444.

Yan, Z.; Nguyen, S.; Poles, M.; Melamed, J. & Scholes, J. V. (1998). Adenovirus colitis in human immunodeficiency virus infection: an underdiagnosed entity. *Am. J. Surg. Pathol.* **22**:1101-1106.

Yee, E. L.; Jiang, B.; Kendall, R. S.; Humphrey, C. & Glass, R. I.. (2006). Group C rotavirus in a pediatric kidney transplant patient with diarrhea. *J. Clin. Virol.* **36**:306–308.

Zheng, D.P.; Ando, T.; Fankhauser, R.L.; Beard, R.S.; Glass, R.I. & Monroe, S.S. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, **346**:312-323.

Ziring, D.; Tran, R.; Edelstein, S.; Mcdiarmid, S. V.; Gajjar, N.; Cortina, G.; Vargas, J.; Renz, J. F.; Cherry, J. D.; Krogstad, P.; Miller, M.; Busttil, R. W. & Farmer, D. G. (2005). Infectious Enteritis after intestinal transplantation: Incidence, Timing and Outcome. *Transplantation* **79**:702-709.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)