

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS ASSOCIADOS COM
GASTROENTERITE AGUDA EM CRIANÇAS MENORES DE TRÊS ANOS DE
IDADE NA CIDADE DE SALVADOR – BAHIA.**

MARIA DA PENHA TRINDADE PINHEIRO XAVIER

Niterói
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIA DA PENHA TRINDADE PINHEIRO XAVIER

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS ASSOCIADOS COM
GASTRENERITE AGUDA EM CRIANÇAS MENORES DE TRÊS ANOS DE IDADE
NA CIDADE DE SALVADOR – BAHIA.

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, como um dos requisitos necessários à aquisição do título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Ciências Médicas.

Orientadores:

Prof. Dra. SOLANGE ARTIMOS DE OLIVEIRA

Dr. JOSÉ PAULO GAGLIARDI LEITE

Niterói
2008

MARIA DA PENHA TRINDADE PINHEIRO XAVIER

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS ASSOCIADOS COM GASTREENTERITE AGUDA EM CRIANÇAS MENORES DE TRÊS ANOS DE IDADE NA CIDADE DE SALVADOR – BAHIA.

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, como um dos requisitos necessários à aquisição do título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Ciências Médicas.

Aprovada em: 29 de Abril de 2008

Examinadores:

Prof. Dra. Cláudia Lamarca Vitral

Prof. Dra. Divina das Dores de Paula Cardoso

Dra. Flavia Barreto dos Santos

Membros Suplentes:

Prof. Dr. Sergio Setúbal

Dr. Eduardo de Mello Volotão

Niterói
2008

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Comparada – Laboratório de Referência Regional para Rotavíruses do Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz e na Universidade Federal Fluminense sob orientação da Dr^a Solange Artimos de Oliveira e Dr. José Paulo Gagliardi Leite.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Luiz Fernando, pelo amor e companheirismo durante todos estes anos, pelo incentivo e exemplo de honestidade e amor a tudo que faz.

Ao mestre Victor Hugo, meu filho especial, minha verdadeira escola de vida. Com ele aprendi o exercício da paciência, da fé e principalmente da superação dos próprios limites.

Ao meu querido filho João Pedro, meu porto seguro, pelos momentos de alegrias, brincadeiras e ajuda na formatação das figuras deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente em minha vida, minimizando as dores e me mostrando os caminhos a serem seguidos.

Aos meus pais biológicos Manoel e Izabel (*in memoriam*), pela oportunidade da vida. A minha eterna saudade.

A minha família adotiva, Nélio, Elisa, Daniele e Nelinho, pela oportunidade de estudo, sem eles o meu caminho teria sido bem mais difícil.

Aos meus irmãos, Inha, Zé, Bê, Lena, Tata, Bel e Manel, sempre presentes em todos os meus momentos.

À minha secretária Suely por cuidar da minha família nos momentos em que eu precisei me ausentar.

Ao meu chefe, orientador e amigo Dr. José Paulo Gagliardi Leite e a Dra Marize Pereira Miagostovich, por confiar a mim este trabalho e me dar a oportunidade de fazer parte da equipe do laboratório de Virologia Comparada. Confesso que vocês foram os responsáveis por resgatar a minha “auto-estima profissional”. Quando cheguei ao laboratório estava retornando à FIOCRUZ depois de um período de quase oito anos de afastamento e saindo de uma das fases mais difíceis da minha vida, mesmo assim vocês me incentivaram a seguir em frente, me incluindo na equipe e me incentivando a concluir este mestrado. Saibam que poderão contar sempre comigo. “A vocês o meu muito obrigada”.

À minha orientadora, Dra. Solange Artimos de Oliveira, por ter aceitado orientar este trabalho, por todos os momentos em que precisei da sua orientação, pelo respeito e carinho que me dispensou durante estes dois anos... Não tem idéia de como isso me fez bem.

A minha querida amiga, companheira de vida e irmã a sabe Deus quantas encarnações, Mônica Simões Rocha Ferreira, pela revisão e sugestões na discussão deste estudo.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Comparada, Alexandre Fialho, Ana Maria Pinto, Carmen Baur, Eduardo Volotão, Edson Pereira, Fabiana Fioretti, Filipe Aníbal Costa, Flávia Guimarães, Gilmar Alcantara, Irene Araújo, Julia, Juliana Bragazzi, Ludimila, Luiz Fernando, Mathias Victoria, Marcelle Silva, Marcos Bryan, Patrícia, Regianne Guedes, Rosane Assis, Tulio Fumian e Silvana Augusta. Todos vocês têm uma parcela de contribuição neste trabalho, seja por uma palavra, um conselho, uma ajuda na bancada, enfim somos uma equipe verdadeiramente vencedora.

A Dra. Jussra Pereira do Nascimento (*in memoriam*), ícone da virologia, pelo primeiro convite que recebi para fazer o curso de mestrado, por todo o apoio e incentivo que me dispensou durante o curto tempo de convívio.

A Dra. Claudia Lamarca Vitral que aceitou ser revisora desta dissertação. Suas correções e sugestões enriqueceram a elaboração final deste trabalho.

A Dra. Divina Cardoso e a Dra. Flávia Barreto dos Santos que mesmo atribuladas de compromissos, aceitaram participar desta banca.

Ao Dr. Eduardo de Mello Volotão e Dr. Sergio Setúbal por aceitarem participar como membros suplentes da banca do mestrado.

A toda minha família e em especial à minha sogra Helena, por sempre rezar por mim.

Aos meus amigos, por brindar por mim com um chope sempre gelado, mesmo na minha ausência.

Aos colegas, professores e à Coordenação do Programa de Mestrado em Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense pelo bom convívio durante o período do mestrado.

Ao Dr. Maurício Barreto, Agostinho Strina, Suzana Ramos e toda a equipe do Serviço de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia, pela coleta das amostras e dos dados da pesquisa.

A todas as crianças que participaram da pesquisa e aos seus pais por permitirem participar deste estudo.

Ao apoio financeiro recebido da Universidade Federal da Bahia através da Pronex 66/086/1998-4-ISC-UFBA, CGLAB-SVS, LVC-LRRGV-IOC-FIOCRUZ e CNPq.

Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela, mas há aquelas que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol.
(Pablo Picasso)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE FIGURAS	XVI
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XIX
1-INTRODUÇÃO.....	20
1.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	20
1.2 - HISTÓRICO DAS GASTRENTERITES VIRAIS	22
1.3- OS NOROVÍRUS E SAPOVÍRUS.....	24
1.3.1- <i>Classificação e estrutura</i>	24
1.3.2 - <i>Patogênese e manifestações clínicas</i>	28
1.3.3 - <i>Diagnóstico laboratorial</i>	29
1.3.4 - <i>Epidemiologia</i>	30
1.4 - OS ROTAVÍRUS.....	31
1.4.1- <i>Classificação e estrutura</i>	31
1.4.2 - <i>Patogênese e manifestações clínicas</i>	36
1.4.3 - <i>Diagnóstico laboratorial</i>	37
1.4.4 - <i>Epidemiologia</i>	38
1.5 - OS ASTROVÍRUS.....	40
1.5.1 - <i>Classificação e estrutura</i>	40
1.5.2 - <i>Patogênese e manifestações clínicas</i>	44
1.5.3 - <i>Diagnóstico laboratorial</i>	45
1.5.4 - <i>Epidemiologia</i>	46
2- RELEVÂNCIA DO ESTUDO.....	48
3- OBJETIVOS.....	50
3.1- GERAL.....	50
3.2 - ESPECÍFICOS	50
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1- MATERIAL	51
4.1.1 - <i>Caracterização da população do estudo</i>	51
4.1.2 - <i>Amostras clínicas</i>	55
4.1.3 - <i>Amostras controles</i>	55
4.1.4 - <i>Oligonucleotídeos</i>	55
4.1.5- <i>“Kits” comerciais utilizados no seqüenciamento de nucleotídeos</i>	58
4.1.6- <i>Soluções</i>	59
4.2 - MÉTODOS	62
4.2.1 - <i>Preparo das suspensões fecais a 10%</i>	62
4.2.2 - <i>Extração do RNA viral pelo método da sílica (Boom et al., 1990)</i>	63
4.2.3 - <i>Reação de transcrição reversa (RT) para a obtenção de cDNA</i>	64

4.2.4- <i>Reação em cadeia pela polimerase para detecção molecular de calivírus humanos (norovírus e sapovírus).</i>	65
4.2.5- <i>Reação em cadeia pela polimerase para detecção molecular de norovírus.</i>	66
4.2.6 - <i>Seqüenciamento parcial do genoma viral de norovírus e sapovírus.</i>	67
4.2.7 - <i>Análise filogenética das seqüências</i>	68
4.2.8- <i>Reação em cadeia pela polimerase para caracterização molecular de RV-A.</i>	69
4.2.9- <i>Reação de amplificação em cadeia pela polimerase, precedida de transcrição reversa para genotipagem dos astrovírus humanos.</i>	71
5 - RESULTADOS	74
5.1 - PESQUISA VIRAL	74
5.1.1- <i>RT-PCR utilizando oligonucleotídeos 289/290 para investigação dos calicivírus humanos.</i>	74
5.1.2- <i>RT-PCR utilizando oligonucleotídeos Mon 431/432/433/434 para investigação dos norovírus genótipos GI e GII .</i>	75
5.2 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS NOROVÍRUS.....	76
5.3 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS SAPOVÍRUS	78
5.4 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ROTAVÍRUS.	80
5.5 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ASTROVÍRUS HUMANOS.	82
6 - DISCUSSÃO	83
7- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	92
7.1 - CONCLUSÕES	92
7.2 - PERSPECTIVAS.....	93
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
9 – ANEXOS	113

LISTA DE ABREVIATURAS

A₂₆₀- absorvância a 260 nm

A- adenina

BA- Bahia

C- citosina

CA- Califórnia

CDC- “Centers for Disease Control and Prevention”

cDNA- DNA complementar

CEP- Comitê de Ética em Pesquisa

dATP- desoxiadenina tri-fosfato

dCTP- desoxicitosina tri-fosfato

dGTP- desoxiguanina tri-fosfato

DMSO- dimetil sulfóxido

dNTP- deoxiribonucleosídeo trifosfato

DNA- ácido desoxirribonucleico

dTTP- desoxiadenina tri-fosfato

dsRNA- RNA dupla-fita

EDTA- trisódio etilenodiamino tetracetato

EGPA- eletroforese em gel de poliacrilamida

EIERA- ensaio imunoenzimático para detecção de rotavírus e adenovírus

EIE- ensaio imunoenzimático

EAdV- adenovírus entérico

EUA- Estados Unidos da América

Fiocruz- Fundação Oswaldo Cruz

G- genogrupo

g- grama
G- guanina
GG- grupo genético ou genótipo
H₂SO₄- ácido sulfúrico
HAstV- astrovírus humano
HAstV 1 a 8- astrovírus genogrupo 1 a 8
HCl- ácido clorídrico
HuCV- calicivírus humanos
IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV- Comitê Internacional de Taxonomia Viral
IF- imunofluorescência
IME- imunomicroscopia eletrônica
ISC-UFBA- Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia
kDa - Kilodalton
LVC-LRRGV- Laboratório de Virologia Comparada-Laboratório de Referência Regional para Gastroenterites Virais
M- molar
ME- microscopia eletrônica
mg- miligrama
MgCl₂. cloreto de magnésio
mL- mililitro
mM- milimolar
mm³ - milímetro cúbico
MS- Microsoft
N- normal
NaOH- hidróxido de sódio
NASBA- amplificação baseada na seqüência do ácido nucléico
ng- nanograma
NLV- “norwalk like-viruses”
nm- nanômetro
NoV- norovírus

Nt- nucleotídeo
NTPase- proteína nucleosídeo trifosfatase
°C- graus centígrados
ORF- fase aberta de leitura
pb- pares de bases
PCR- reação em cadeia pela polimerase
pH- concentração de íons de hidrogênio livre
q.s.p.- quantidade suficiente para
RJ - Rio de Janeiro
RNAsin - inibidor de RNAase
RpRd - RNA polimerase RNA dependente
RT-PCR - Reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa
RV-A - rotavírus do grupo A
SA11- cepa de rotavírus símio
SRSV- “Small round structure vírus”
ssRNA- RNA de fita simples
T- timina
TBE- tris borato EDTA
Tris- hidroximetil-tris-aminometano
U- uracila
VP- proteína Viral
µL - microlitro
µM -micromolar
3D - três dimensões

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia pela polimerase para detecção e genotipagem do norovírus GI e GII, p.56

Tabela 2- Oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia pela polimerase para detecção dos calicivirus (norovírus e sapovírus), p.56

Tabela 3- Oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia pela polimerase para genotipagem do rotavírus do grupo-A, p.57

Tabela 4- Oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia pela polimerase para genotipagem do astrovírus, p.57

Tabela 5- Oligonucleotídeos utilizados na *Nested-PCR* (multiplex-RT-PCR) para genotipagem dos astrovírus 1- 8, p. 58

Tabela 6- Mistura de reagentes utilizados na reação de transcrição reversa cDNA, p. 64

Tabela 7- Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para calicivirus humanos, p.65

Tabela 8- Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para norovírus (Região B), p.66

Tabela 9- Reagentes utilizados na reação de seqüenciamento para caracterização molecular do norovírus e do sapovírus, p. 68

Tabela 10- Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para genotipagem dos rotavírus do grupo-A, p. 69

Tabela 11- Reagentes utilizados na reação de semi-*Nested-PCR* para caracterização molecular dos rotavírus do grupo-A, p.70

Tabela 12- Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa para a genotipagem dos astrovírus humanos, p.72

Tabela 13- Reagentes utilizados na *Nested-PCR* para a genotipagem dos astrovírus humanos, p.73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Morfologia e estrutura tridimensional dos norovírus, p.24

Figura 2- Organização do genoma dos norovírus, p.26

Figura 3- Árvore filogenética baseada na seqüência total de aminoácidos do capsídeo viral do gênero *Norovirus*, p.27

Figura 4- Esquema representativo do RNA segmentado, das proteínas estruturais e não estruturais codificadas e a localização no vírion. Estrutura 3D da partícula do RV, p. 34

Figura 5- Esquema representativo dos diferentes grupos de rotavírus analisados em gel de poliacrilamida, p. 35

Figura 6- Distribuição continental/subcontinental do RV-A com as combinações binárias G e P, p.40

Figura 7- Árvore filogenética dos astrovírus baseada na seqüência da fase aberta de leitura 2 (ORF2), p.42

Figura 8- Morfologia do astrovírus. Micrografia eletrônica das partículas de astrovírus, algumas com aspecto estelar,p. 43

Figura 9- Organização do genoma dos astrovírus humano, p. 44

Figura 10- Fluxograma do monitoramento da população do estudo, p. 54

Figura 11- Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados por reação em cadeia pela polimerase, utilizando oligonucleotídeos 289/290, p. 75

Figura 12- Árvore filogenética do sapovírus baseado na seqüência de nucleotídeos da região da polimerase, p.76

Figura 13- Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados por reação em cadeia pela polimerase, utilizando oligonucleotídeos Mon 431/432/433/434, p.77

Figura 14- Árvore filogenética do norovírus baseado na seqüência de nucleotídeos da ORF1 (Região B), p.79

Figura 15- Eletroforese em gel de agarose dos produtos da RT-PCR para amplificação de VP7 (G-tipo) e VP4 (P-tipo) do rotavírus do grupo A, p.81

Figura 16- Eletroforese em gel de agarose dos produtos da *Nested*-PCR para determinar os genótipos específicos G e P do rotavírus grupo A, p.81

Figura 17- Eletroforese em gel de agarose dos produtos da *Nested*-PCR para determinar o genótipo específico do astrovírus humano, p.82

RESUMO

Estudos baseados em comunidades fornecem informações que representam geograficamente o perfil das doenças diarréicas infantil. Entretanto, nos países em desenvolvimento, são poucos os estudos que relatam a circulação das principais viroses gastroentéricas em uma mesma comunidade. Este estudo apresenta os dados da investigação da freqüência da infecção dos norovírus e sapovirus em crianças com gastroenterite aguda participantes de um estudo longitudinal em comunidades carentes da cidade de Salvador, BA, Brasil. A caracterização molecular de outros vírus entéricos previamente detectados nesta mesma população também foi realizada. Este estudo representa a continuidade de um projeto anterior desenhado para estabelecer o perfil dos patógenos entéricos mais prevalentes nessas comunidades. Neste estudo, 139 amostras fecais coletadas no período de julho de 2001 a janeiro de 2002 foram analisadas por RT-PCR usando inicialmente um conjunto de oligonucleotídeos para detecção de calicivirus humanos (norovirus e sapovirus) e um específico para norovirus. Sete amostras (5,0%) foram positivas para calicivirus e 11 amostras (7,9%) para norovirus. Uma amostra foi caracterizada como SaV e sete amostras como norovirus do genogrupo GII, por seqüenciamento de nucleotídeos. A caracterização molecular do rotavírus do grupo A (RV-A) e astrovírus (HAstV), previamente detectados, revelou a circulação do RV-A genótipos G1P[8] e G9P[8] e HAstV genótipos 6, 7 e 8. Não foram observadas infecções mistas. Estes achados apontam para a grande diversidade dos genótipos dos mais importantes vírus associados às gastroenterites agudas circulando em comunidades carentes.

ABSTRACT

Community based studies provide geographically representative information on the acute diarrhea disease burden. However, there are only a few reports in developing countries concerning the genotypes of the most important gastro enteric viruses in such communities. This study presents the results obtained by investigating the presence of Norovirus in children with acute gastroenteritis from a longitudinal study in low-income communities of the city of Salvador, BA, Brazil. This study represents an extension of a previous work performed to establish the profile of the most prevalent enteric pathogens present in these communities. In this study, 139 fecal samples collected from July 2001 to January 2002 were analyzed by RT-PCR using a set of primers for calicivirus (norovirus and sapovirus) and a specific set of primers for NoV. Seven out of 139 (5.0%) and 11 (7,9%) samples were positive for calicivirus and norovirus, respectively. One sample was characterized as human sapovirus and seven isolates were characterized as NoV genotype GII. The molecular characterization of the previously detected group A rotaviruses (RV-A) and human astroviruses (HAstV) was also performed and revealed the circulation of RV-A genotypes G1P[8] and G9P[8]; and HAstV genotypes 6, 7, and 8. No mixed infection was observed. These findings pointed out the circulation of a great diversity of genotypes of the most important viruses responsible for acute gastroenteritis circulating in low-income communities.

1-INTRODUÇÃO

1.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

A gastroenterite em crianças menores de cinco anos de idade representa um problema social, econômico e de saúde pública relevante tanto nos países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. Após as doenças respiratórias agudas, a diarreia infantil representa a mais importante causa de morbidade e mortalidade infantil nos diferentes continentes. Embora seja rara, a mortalidade por essa doença em países desenvolvidos, onde a população tem acesso a programas de saúde, ainda se observa alta taxa de morbidade, o que representa alto custo para esses países. É também um indicador de saúde capaz de expressar desigualdade social, pois a doença se apresenta de forma mais grave em populações infantis expostas às piores condições de saneamento e nutrição, além do acesso ao sistema de saúde ser precário ou mesmo inexistente (Loopman et al.,2004; Bryce et al., 2005; Cheng et al.,2005; Charles et al., 2006; Marocco et al., 2006; Barreto et al., 2007).

Diversos patógenos infecciosos são associados às doenças diarreicas, sendo que as infecções intestinais bacterianas e parasitárias são diretamente relacionadas às condições de saneamento e socioeconômicas da população enquanto que os vírus representam um problema de saúde pública mesmo em países desenvolvidos.

A diarreia aguda é uma síndrome resultante da infecção da mucosa intestinal, causada por diversos patógenos como bactérias, vírus e outros parasitos que acometem tanto humanos como animais. Sem sinais clínicos que permitam um diagnóstico diferencial do agente etiológico associado a esta doença, a identificação deste é feita através de diagnóstico laboratorial (Kilgore & Glass, 1997).

Mais de 20 vírus são reconhecidos como importantes agentes etiológicos associados à diarreia aguda em humanos. Dentre os vírus de maior importância clínica associada aos episódios de gastroenterite aguda, destacam-se: os rotavírus (RV), os norovírus (NoV), os astrovírus humanos (HAstV) e os adenovírus entéricos (EAdV) (Glass et al., 2001; Okitsu-Negishi et al., 2004; Akihara et al., 2005; Sdiri-Loulizi et al., 2008).

Esses vírus afetam principalmente crianças nos primeiros anos de vida e tem sido descrito como causam comum de gastroenterite, especialmente em países onde há grande diferença entre as classes sociais em termo de higiene, qualidade da água, preparo dos alimentos e saneamento (Gallimore et al., 2004; Akihara et al., 2005; Gabay et al., 2005; Vernacchio et al., 2006)

A transmissão acontece através de ingestão de água e alimentos contaminados, do contato pessoa-pessoa, das precárias condições de higiene e saneamento ou mesmo através de aerossóis produzidos durante os episódios de vômito (Matsui & Greenberg, 2001; Koopmans, 2002; Meakins et al., 2003).

As manifestações clínicas típicas das gastroenterites incluem diarreia, náusea, febre, dor abdominal, cefaléia e vômito. Todos os sinais e sintomas da gastroenterite podem apresentar-se individualmente ou em conjunto e assemelhar-se àqueles causados por outras etiologias (toxinas, drogas etc). Em lactentes e crianças, a acentuada perda de eletrólitos e líquidos provocada por quadros de diarreia grave pode levar à desidratação e a complicações que podem resultar em óbito (Uhnou et al., 1986; Linhares et al., 1994; Kilgore & Glass, 1997 Parashar et al., 2003; Sdiri-Loulizi et al., 2008).

As infecções sintomáticas são mais comuns em crianças entre seis meses e dois anos de idade, enquanto que as assintomáticas são comuns em lactentes com menos de seis meses de vida, período em que há proteção por anticorpos maternos adquiridos de forma passiva (Kapikian et al., 2001).

A gastroenterite é uma doença autolimitada, porém, a correção da perda de água e eletrólitos através da re-hidratação oral ou intravenosa é necessária para evitar que a doença evolua para quadros mais graves (Kapikian et al., 2001).

No Brasil, a maioria das pesquisas publicadas sobre o papel dos vírus na diarreia infantil é feita em ambientes hospitalares, creches, asilos ou em ambientes fechados (Leite et al., 1991; Linhares et al., 1994; Araújo et al., 2001; Silva et al., 2001; Gallimore et al., 2004; Carneiro et al., 2005; Santos et al., 2005; Borges et al., 2006; Carvalho-Casta et al., 2006; Araújo et al., 2007; Victoria et al., 2007a), o que gera uma lacuna no conhecimento do comportamento dos agentes virais em comunidades e como tais agentes se distribuem naturalmente nestes ambientes. Estas informações são importantes para o estabelecimento de estratégias de prevenção e de controle destas viroses (Barreto et al., 2006).

1.2 - HISTÓRICO DAS GASTRENTERITES VIRAIS

Desde a década de 40, os quadros de diarreias agudas com etiologia desconhecida eram suspeitos de serem causados por vírus (Light & Hodes, 1943). Em 1968, um surto de gastroenterite aguda ocorreu entre estudantes e professores de uma escola em Norwalk, Ohio. Como a doença foi caracterizada por náuseas e vômitos em mais de 90% dos casos, o episódio ficou conhecido como a doença do vômito do inverno (Adler & Zick, 1969).

Somente na década de 70, através da técnica de imuno-microscopia eletrônica (IME), Kapikian e colaboradores (1972), identificaram uma partícula de 27 nm de diâmetro, com características semelhantes a vírus, em filtrados de fezes utilizados para induzir doenças em humanos voluntários, as quais deram o nome de Norwalk Like Virus (NLV), por ter sido associado ao episódio de gastroenterite aguda em Norwalk, Ohio. Por se tratar de vírus pequenos e arredondados, estes vírus eram reconhecidos como “pequenas estruturas redondas semelhantes a vírus” (SRSV- “small round-structured virus”) e receberam diferentes denominações: Hawaii, Snow Mountain, Sapporo, Southampton, Tauton, Toronto, México, entre outras, em consequência da localidade do surto na qual foram inicialmente detectados (Atmar & Estes, 2001).

O NLV foi inicialmente classificado na família *Picornaviridae* baseado na morfologia do vírion pela microscopia eletrônica (ME). Entretanto, após estudos moleculares, a presença de uma proteína estrutural principal no vírion purificado de material humano foi considerado como uma característica para associação com a família *Caliciviridae*. Esta classificação foi apoiada pela semelhança da seqüência do Norwalk vírus com outros vírus da família *Caliciviridae*. O gênero NLV foi renomeado como *Norovirus*, tendo como espécie protótipo o vírus Norwalk (Green et al., 2000).

Ainda na década de setenta, Bishop e colaboradores (1973), através da ME, relataram a presença de partículas virais em células da mucosa do duodeno de uma criança com gastroenterite aguda, com características semelhantes aos reovírus, sendo denominadas de orbivírus, e em 1973, Flewett e colaboradores visualizaram através da ME partículas com aspecto de roda, as quais foram chamadas de rotavírus (RV). A partícula viral observada tinha o tamanho de 70nm e foi logo associada aos episódios de diarreias graves em crianças. Os RV surgem então como a causa mais comum de diarreia em bebês e crianças, tanto em países de clima tropical como temperado. Posteriormente, os rotavírus do grupo A (RV-A) passaram a serem considerados os agentes etiológicos mais comuns de diarreia aguda em crianças hospitalizadas universalmente (Linhares et al., 1989; Kapikian et al., 2001; Chen et al., 2007).

A associação dos HAstV com as gastroenterites no homem ocorreu em 1975, em estudos realizados por Appleton & Higgins (1975), que visualizaram através da ME numerosas partículas arredondadas de pequenos vírus, com tamanhos que variavam de 28-30nm de diâmetro, detectadas em espécimes fecais de recém nascidos hospitalizados e de surtos em maternidades. Ainda em 1975, Madeley & Cosgrove, relataram que, através da ME, algumas dessas partículas apresentavam morfologia semelhante a uma estrela de cinco ou seis pontas, denominando-as astrovírus.

1.3- OS NOROVÍRUS E SAPOVÍRUS

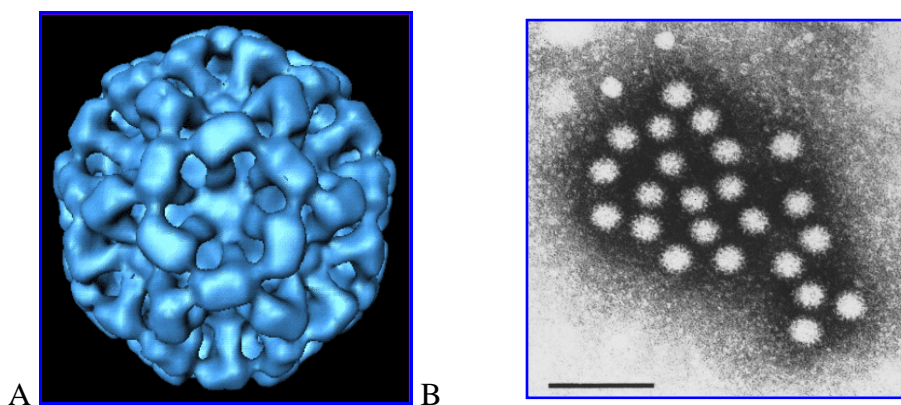
1.3.1- Classificação e estrutura

Os NoV pertencem a família *Caliciviridae*. Esta família viral foi estabelecida no Terceiro Encontro do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, realizado em 1979, sendo esta nomenclatura relacionada a presença de depressões semelhantes a uma taça na superfície do capsídeo (latim “*calix*”). É composta por quatro gêneros: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus* e *Vesivirus* (Green et al., 2000).

Os *Lagovirus* e *Vesivirus* são associados à infecção em animais, enquanto que os *Norovirus* e os *Sapovirus* (SaV) infectam principalmente humanos. Os NoV e os SaV, são importantes agentes etiológicos associados à gastroenterite aguda, sendo que os NoV destacam-se pela importância clínica e epidemiológica e os SaV, até o momento são pouco relatados (Green et al., 2006).

Os NoV apresentam uma partícula com diâmetro que varia de 27 a 40nm (Figura 1), não envelopada e o genoma é constituído de RNA de fita simples (RNAss), polaridade positiva, com aproximadamente 7.7kb. Quanto a organização o genoma viral apresenta três regiões de leitura aberta (ORFs), uma região não traduzida (UTR), tanto no extremo 3' quanto no extremo 5', e uma cauda poli(A) no terminal 3' (Figura 2) (Hardy, 2005).

Figura 1 – Estrutura e morfologia tridimensional dos Norovírus



(A) Criomicroscopia eletrônica. (B) Imunomicroscopia eletrônica - Barra: 100nm
* Prasad et al. (1999).

A região ORF1 dos NoV codifica uma poliproteína de cerca de 200 kDa, precursora de diversas proteínas não estruturais. É dividida em seis domínios funcionais conhecidos como: a) NTPase (Proteínas Nucleosídeo Trifosfatase); b) VPg (proteína de união ao genoma); c) pro (proteínases); d) Pol (polimerase) representados na Figura 2 (Green. 2006).

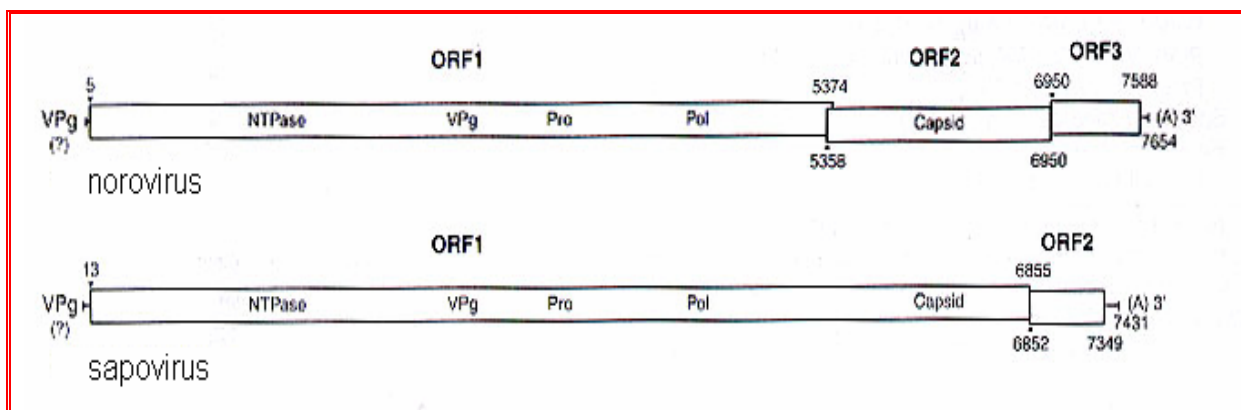
As regiões ORF2 e ORF3 codificam as proteínas estruturais do capsídeo do NoV. ORF2 codifica uma proteína principal de 60 kDa de massa molecular, denominada VP1, que compõe o capsídeo viral. A ORF3 codifica uma proteína estrutural menor, denominada VP2, localizada na região 3' do genoma, que regula a expressão da VP1, podendo participar do processo de encapsidação do RNA genômico e montagem do virion (Glass et al., 2000; Hardy, 2005).

Atualmente, os NoV podem ser classificados em cinco genogrupos (GI-GV), baseando-se na análise da seqüência dos nucleotídeos (nt) da região que codifica para a proteína de capsídeo viral (VP1), sendo que os genogrupos GI, GII, GIV estão associados à infecção em humanos, com exceção do GIII/11 que é de origem suína. Até o momento, o NoV GIII tem sido associado a infecções em bovinos e o GV em murinos (Zheng et al., 2006).

Devido à diversidade genética e molecular, os genogrupos dos Nov são constituídos de grupos genéticos (GG) que representam a unidade mínima de classificação dos NoV (Figura 3): o genogrupo I, com oito grupos genéticos; o genogrupo II, com 17 grupos genéticos; o genogrupo III, com dois grupos genéticos; e os genogrupos IV e V, com um único grupo genético cada. (Zheng et al., 2006).

Os vírus do gênero *Sapovirus* apresentam tamanho um pouco maior, variando de 41-46nm de diâmetro, são desprovidos de envelope e o material genético é constituído de ssRNA com polaridade positiva. Pode ser dividido em cinco genogrupos (GI-GV), sendo que os GI, GII, GIV and GV são reconhecidos por causar doença em humanos e o GIII em suínos (Green et al., 2001; Chan et al., 2006; Hansman et al., 2007). O genoma viral é organizado em duas ORFs (ORF1 e ORF2) (Fig 2). A ORf 1 codifica uma proteína precursoras das proteínas não estruturais e a VP1 e a ORF2 codifica a proteína VP2. São associados com 1,8 a 9% dos casos de gastroenterites aguda infantil (Wang et al., 2005).

Figura 2 - Organização do genoma dos calicivirus *.



NTPase: Proteína Nucleosídeo Trifosfatase; VPg: Proteína de União ao Genoma; pro: Protease; Pol: Polimerase; (A)₃: Cauda Poli(A).

* Adaptado de Green (2006).

1.3.2 - Patogênese e manifestações clínicas

Os NoV são altamente infecciosos e sua rota de transmissão é fecal-oral. Disseminam-se principalmente através da ingestão de alimentos e águas contaminadas e transmissão pessoa-a-pessoa, particularmente em lugares de grande aglomeração como creches, escolas, hospitais, navios e águas de recreação (Maunula et al., 2004; Goodgame, 2007, Kroneman et al 2008).

A replicação inicia-se com a fase de adsorção dos NoV aos receptores presentes nos enterócitos e nas células epiteliais das mucosas intestinais conhecidos como antígenos do grupo histo-sangüíneo (HBGA), que funcionam como receptores celulares. Os HBGA são carboidratos complexos presentes nas glicoproteínas ou glicilipídeos dos eritrócitos e das células epiteliais da mucosa intestinal (Tan et al., 2004).

O período de incubação pode variar de 10 a 51 horas após contato com o vírus, podendo ser eliminado por até 22 dias (Clark & McKendrick, 2004; Thornton et al., 2004; kroneman et al., 2008).

A infecção pode ocorrer de forma assintomática ou com diarreia e vômitos, sendo estas acompanhadas ou não de outras manifestações como cefaléia, febre, mialgia e dores abdominais. Geralmente os adultos desenvolvem diarreia como a principal característica da doença, enquanto que nas crianças a principal característica clínica é o vômito (Green et al., 2001; Koopmans, 2002; Lopman et al., 2004).

Como acontece nos quadros de diarreia, a perda líquida durante os episódios mais graves e os vômitos concomitantes agravam a doença, que pode evoluir com desidratação e desequilíbrio eletrolítico, resultando na internação do paciente. As crianças menores de três anos de idade, os idosos e as pessoas imunocomprometidas são as mais gravemente afetadas (Wilhelmi et al., 2003; Thornton et al., 2004; Goodgame, 2007).

1.3.3 - Diagnóstico laboratorial

A visualização direta de material fecal por IME foi o primeiro método utilizado para detecção dos NoV (Kapikian et al., 1972). A IME é uma técnica que se mostra pouco sensível para o diagnóstico dos NoV, uma vez que amostras que apresentam pequeno número de partículas virais dificultam a visualização das partículas dos NoV (Atmar & Estes, 2001).

Até o momento ainda não se estabeleceu um modelo de cultivo celular eficiente para o isolamento viral, o que dificulta o estudo deste agente *in vitro* (Straub et al., 2007). Os métodos imunoenzimáticos (EIE), utilizando sistema de antígeno-anticorpo, apresentam sensibilidade baixa comparados aos métodos moleculares, porque não são capazes de detectar todos os tipos de NoV devido à diversidade antigênica apresentada por estes vírus, porém são utilizados em surtos como métodos de triagem. Testes moleculares devem ser aplicados nas amostras com resultados negativos por EIE (Okitsu-Negishi et al., 2004; Borges et al., 2006).

A técnica de reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR) é o método mais indicado para o diagnóstico dos NoV, sendo capaz de detectar até 10 cópias de transcrito, permitindo o diagnóstico mesmo após o período agudo da doença (Atmar & Estes, 2001).

A região da polimerase (RdRd) foi utilizada como alvo para o desenho dos primeiros oligonucleotídeos e sondas utilizados para detecção e genotipagem dos NoV. Outra região utilizada para desenho dos oligonucleotídeos empregados na reação de RT-PCR, tanto para detecção como caracterização molecular dos genogrupos GI e GII, é a região codificante amino-terminal do capsídeo viral (Região B), a qual se mostrou mais eficiente que os oligonucleotídeos da região do gene RdRb (Kojima et al., 2002).

A técnica de PCR em tempo real após a transcrição reversa oferece a vantagem de detectar cópias de RNA sem reatividade cruzada com outros vírus

entéricos, além de estimar a concentração viral. Porém, tem a desvantagem dos “amplicons” gerados não poderem ser utilizados em reações de seqüenciamento para a determinação dos genótipos (Richards et al., 2004; Trujillo et al., 2006).

1.3.4 - Epidemiologia

Os NoV constituem um dos vírus mais comuns presentes em surtos de diarreia e representam o segundo agente etiológico de importância clínica em casos esporádicos em crianças menores de cinco anos de idade. Infectam indivíduos de todas as faixas etárias, mas a maior incidência da doença é entre crianças menores de cinco anos de idade e pessoas idosas, representando um significativo problema de saúde pública no mundo inteiro. Em crianças imunossuprimidas e portadores de câncer, tem sido relatado que os NoV são importantes patógenos oportunistas (Glass et al., 2000; Koopmans, 2002., Rodriguez-Guillen et al., 2005; Goodgame, 2007).

Os NoV apresentam distribuição mundial, com picos sazonais que variam de acordo com o continente ou a região estudada. Surtos e casos esporádicos podem ocorrer durante todos os meses do ano (Mounts et al., 2000).

São vírus altamente infecciosos, bastando um inóculo de 10^1 - 10^2 partículas para causar a infecção. Pelo fato das manifestações clínicas devido à infecção pelo NoV serem facilmente confundidas com outras viroses gastrointestinais, o diagnóstico só é possível através da utilização de testes laboratoriais (Turcios et al., 2006).

A prevalência detectada nos casos esporádicos de gastroenterites não tem diferença entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento. O genótipo mais frequentemente detectado mundialmente é o GII, e o grupo genético mais comum é o GII-4 (Bon et al., 2005; Okada et al., 2005).

No Brasil, são poucos os trabalhos publicados sobre a ocorrência dos NoV. Em um estudo realizado em São Paulo, amostras de fezes de crianças com e sem diarreia foram analisadas pela ME, onde partículas de HuCV foram observadas (Timenetsky et al., 1993). Posteriormente, Parks e colaboradores (1999), publicaram um estudo de prevalência, onde detectaram o NoV em 7% das amostras analisadas. Com o advento da biologia molecular e a utilização de testes enzimáticos, foi possível o desenvolvimento de métodos capazes de determinar a presença e a caracterização molecular em diversas pesquisas realizadas em São Paulo, Brasília, Goiânia e Rio de Janeiro (Gallimore et al., 2004, Castilho et al., 2006; Borges et al., 2006; Soares et al., 2007; Victoria et al., 2007a; Ferreira et al., 2008).

Os SaV tem sido associados à gastroenterite infantil de pouca gravidade, raramente relatados à casos de hospitalização em contraste com as infecções associadas aos NoV. São raros os relatos de infecções associados aos SaV. A prevalência varia de 1,8 a 9% em casos esporádicos de gastroenterite infantil e varia de acordo com o país e a técnica de detecção utilizada. Futuros estudos são necessários para que se possa estabelecer a prevalência dos SaV, inclusive no Brasil, onde são raros os relatos deste patógeno (Wang et al., 2005; Hansman et al., 2007)

1.4 - OS ROTAVÍRUS

1.4.1- Classificação e estrutura

O gênero *Rotavirus* pertence à família *Reoviridae* e é constituído de vírus não envelopados de estrutura icosaédrica com aspecto radiado medindo 70-90 nm de diâmetro. Estruturalmente, a partícula viral é composta por três camadas protéicas

(triplo capsídeo): capsídeo externo, composto pelas proteínas VP4 (clivada por proteases em VP5 e VP8) e VP7, que são as proteínas responsáveis pela ligação e penetração dos RV nos enterócitos; capsídeo intermediário, composto pela proteína VP6, que é a proteína encontrada em maior quantidade na partícula viral, apresentando-se altamente antigênica e imunogênica; e o capsídeo interno ou *core* viral, onde se encontra o genoma viral segmentado e as proteínas VP1, VP2 e VP3 (Figura 4) (Kapikian et al., 2001).

O genoma viral é constituído por RNA de fita dupla (dsRNA) dividido em 11 segmentos que variam de 667 a 3302 pares de base (pb). O genoma total é composto por aproximadamente 18.522pb, que são responsáveis pela síntese das proteínas virais estruturais (VP) e as proteínas não estruturais (NSP) (Kapikian et al., 2001).

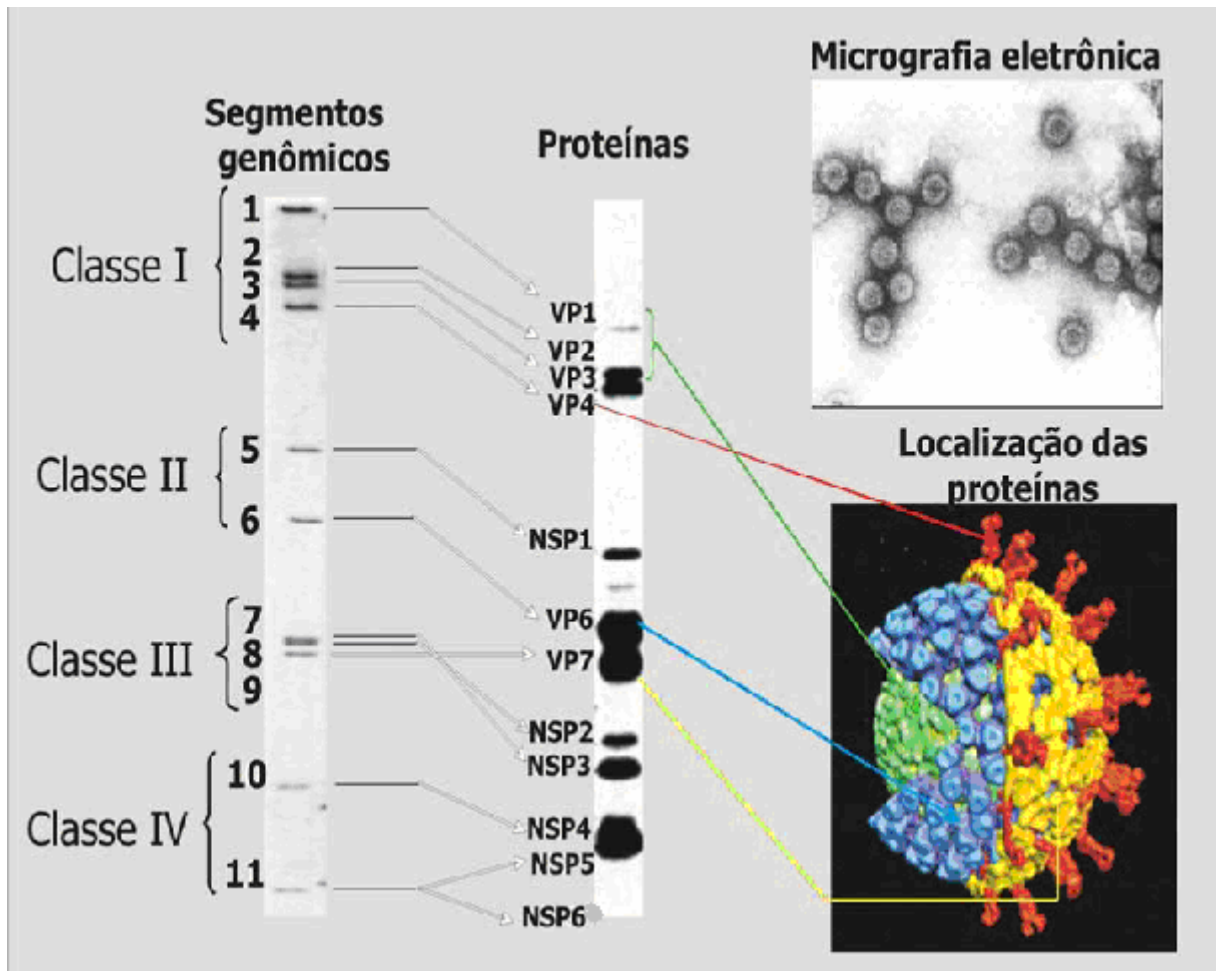
Os RV apresentam diversidade genética e antigênica, o que permite classificá-los em sete grupos sorologicamente distintos, denominados de A a G, tendo como base a reação sorológica aos epítomos presentes na proteína do capsídeo intermediário VP6. Esta classificação pode ser observada também pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), com base no perfil de migração dos 11 segmentos do dsRNA. Esses segmentos são facilmente observados, distribuídos em quatro classes as quais são numeradas pela ordem de migração no gel: classes I (segmentos 1, 2, 3 e 4), II (5 e 6), III (7, 8 e 9) e IV (10 e 11). A velocidade de migração dos segmentos “10” e “11” determina o perfil longo (migração rápida) ou curto (lenta), havendo, ainda, o padrão “super curto” (Figuras 4 e 5) (Estes, 2001; Kapikian et al., 2001).

As infecções em humanos têm sido atribuídas aos RV dos grupos A, B e C. Os RV dos grupos grupo D-G foram identificados, até o momento, somente em animais. Os RV do grupo A (RV-A) são os de maior prevalência, sendo os responsáveis por episódios de diarreia aguda em crianças abaixo de cinco anos de idade em todo o mundo. Devido à importância epidemiológica, os RV-A são os mais comumente estudados (Kapikian et al., 2001).

As partículas virais maduras dos RV-A possuem seis proteínas estruturais (VPs) e seis proteínas não estruturais (NSPs), que são codificadas pelos 11 segmentos ou genes do dsRNA. Cada gene codifica para uma proteína viral, com exceção do gene 11 que codifica para duas proteínas. Os genes de 1-4 codificam as proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4, respectivamente; o gene 6 codifica a VP6; e a proteína VP7 pode ser codificada pelos genes 7,8 ou 9, dependendo da amostra de RV-A. Os demais segmentos codificam as proteínas não-estruturais: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6 (Figura 4) (Kapikian et al., 2001).

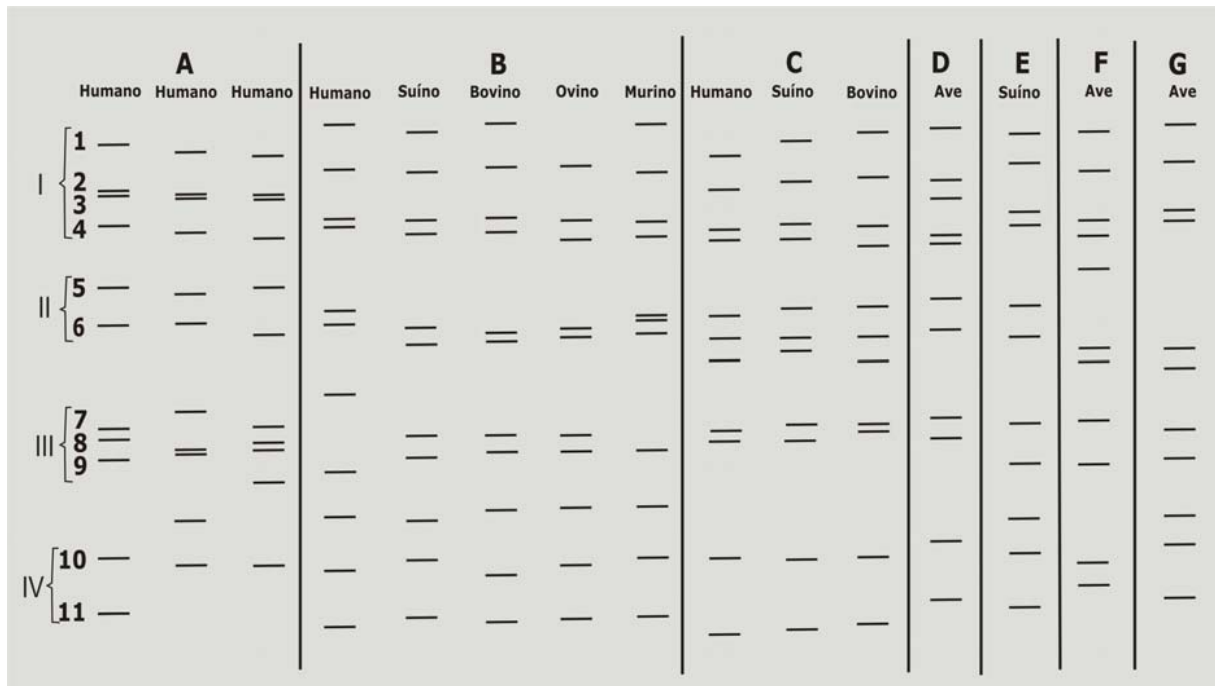
Os RV-A são também classificados em subgrupos (SG): SGI, SGII, SGI+II e SG não I e não II de acordo com as reações sorológicas a diferentes epítomos presentes na VP6 (Estes, 2001). O SGII é o mais freqüentemente encontrado entre os humanos, enquanto o SGI é o mais detectado entre as amostras de origem animal (Iturriza-Gómara et al., 2002).

Figura 4 - Esquema representativo do RNA segmentado, das proteínas estruturais e não estruturais codificadas e a localização no vírion. Estrutura 3D da partícula do RV.



Genoma segmentado: Separação dos 11 segmentos de RNA, em eletroferese em gel de poliacrinamida (EGPA), da CEPA de RV SA11; **Proteínas:** Separação EGPA, das proteínas sintetizadas pela CEPA de RV SA11 (6 VP e 6 NSP); **Micrografia eletrônica:** Partículas de RV (Gentilmente cedida pelo LCV-LRRR); **Localização das proteínas:** VPs da partícula completa do RV, com as 3 camadas do capsídeo. Estrutura 3D da partícula do RV (Prasad et al., 1988, com modificações).

Figura 5- Esquema representativo dos diferentes grupos de rotavírus analisados em gel de poliacrilamida.



RV-A: CEPA Humano WA perfil longo; CEPA 69M perfil curto de migração em EPGA (Adaptado de Kapikian et al., 2001).

O padrão eletroforético exibido pelos RV-A nem sempre é observado como descrito na literatura devido à natureza segmentada do RNA viral, que permite a ocorrência de polimorfismo eletroforético, freqüentemente observado nos estudos de diversidade genética (Iturriza-Gómara et al., 2001).

Esta diversidade está relacionada a diferentes mecanismos genéticos que ocorrem com os RV, tais como: a) as mutações pontuais, que podem ser conservadas e transmitidas para a progênie viral, onde podem se acumular. Essas mutações podem ser usadas para definir novas linhagens e sublinhagens dentro de um mesmo genótipo, tornando-se úteis para classificação e de importância epidemiológica (Iturriza-Gómara et al., 2001); b) os rearranjos (recombinação intramolecular), que representam alterações na seqüência do segmento genômico, algumas vezes na forma de deleção ou mais freqüentemente como duplicação,

podendo resultar em erros de transcrição de um único segmento (Kobayashi et al, 1996); e c) as reestruturações (*reassortments*), que foram descritas por Matsuno e colaboradores (1980) através da realização de uma co-infecção em cultura celular de rotavírus bovino (Lincoln) e rotavírus símio (SA-11), onde obtiveram o primeiro clone reestruturado. Este mecanismo é o resultado da seleção de certos grupos de segmentos durante a formação de um genoma reestruturado.

Os RV-A também recebem uma classificação binária com base nas diferenças antigênicas das proteínas que constituem o capsídeo externo, que são as proteínas estruturais VP7 e VP4 (Estes, 2001; Kapikian et al., 2001).

A VP7 é uma glicoproteína que determina a especificidade de sorotipo/genótipo G-tipo. Atualmente, já são conhecidos 15 G tipos, dez dos quais são encontrados em humanos, entre estes os G1, G2, G3 e G4 são os mais prevalentes. Entretanto, estudos mostram que o sorotipo G9 vem emergindo em diversos países, inclusive no Brasil (Araújo et al., 2001; Rahman et al., 2005; Santos et al., 2005). A VP4 é uma proteína estrutural sensível à protease, que permite a classificação dos RV-A em sorotipos/genótipos P-tipos. Através de métodos sorológicos são identificados os sorotipos P (representado pela letra P seguida de números) e por métodos moleculares os genótipos P (representados pela letra P seguida de números dentro de colchetes). Atualmente já são conhecidos 27 genótipos P (Martella et al., 2006).

1.4.2 - Patogênese e manifestações clínicas

A via de infecção habitual é a fecal-oral. As excreções ocorrem em concentrações de até 10^{12} partículas/mL de fezes e a carga viral para causar infecção é de apenas 10 partículas viáveis, o que denota a elevada infecciosidade

dos RV-A. O período de incubação da infecção por RV-A é em torno de 24 a 48 horas, durante o qual já ocorre a eliminação de partículas viáveis nas fezes do indivíduo contaminado. O quadro agudo da doença apresenta uma duração que pode variar de cinco a sete dias (Estes, 2001).

Dentre os quadros de diarreia causados por agente virais, os sinais clínicos de maior gravidade estão associados aos RV-A. Frequentemente, são observados episódios de diarreia, febre e vômitos, que podem apresentar-se de forma branda ou culminar com quadros mais graves evoluindo para desidratação e óbito. Pode ser observada também a forma assintomática, comumente encontrada em crianças menores de quatro meses e nos neonatos, provavelmente devido à proteção conferida pelos anticorpos maternos (Linhares et al., 1989; Kapikian et al., 2001).

Os RV apresentam tropismo natural para os enterócitos maduros localizados no terço apical das vilosidades do intestino delgado (Kapikian et al., 2001). O mecanismo pelo qual os RV-A desencadeiam a diarreia é multifatorial. Pode ocorrer a destruição dos enterócitos maduros, com baixa absorção intestinal de lactose, trazendo, como consequência, o aumento da osmolaridade intestinal e de perdas líquidas. Outro mecanismo descrito é a liberação de íons de Ca^{+2} do retículo endoplasmático rugoso para o citoplasma, ativando enzimas intracelulares e morte celular com liberação de vírus maduro. Este mecanismo é desencadeado pela proteína NSP4, considerada a enterotoxina viral (Estes 2001; Kapikian et al., 2001).

1.4.3 - Diagnóstico laboratorial

A ME foi a primeira técnica utilizada para detecção da partícula de RV (Bishop et al., 1973). Apresenta boa especificidade devido à característica morfológica típica de RV que o distingue de outros vírus gastroentéricos (Kapikian et al., 2001).

O diagnóstico é feito a partir da detecção de vírus em fezes de pacientes com diarreia e os métodos de escolha pela maioria dos laboratórios são os EIE, por serem de fácil utilização e apresentarem sensibilidade e especificidade aceitável, e a aglutinação em esferas sensibilizadas com anticorpos monoclonais e policlonais (aglutinação em látex). No Brasil, um kit para detecção simultânea de RV e AdV (EI ERA), foi descrito por Pereira e colaboradores (1985), sendo utilizado em âmbito nacional com grande valor em termos epidemiológicos.

Outra técnica amplamente utilizada é a Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA), onde através da visualização do padrão de migração dos 11 segmentos de RNA é possível a detecção e a classificação dos sete grupos de rotavírus A-G (Figura 5). A EGPA apresenta boa sensibilidade e especificidade, o que possibilita a detecção de perfis genômicos muitas vezes atípicos (Pereira et al., 1983)

Dentre as diferentes técnicas de detecção utilizadas tanto na pesquisa como no diagnóstico de rotina dos RV, a técnica de RT-PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade, além de permitir a genotipagem das amostras em G e P. Através de iniciadores de cadeia consensuais e específicos é feita uma amplificação enzimática dos genes VP4 (genótipos P) e VP7 (genótipo G) (Gentsch et al., 1992; Das et al., 1994). A RT-PCR em tempo real também é uma técnica que vem sendo utilizada por permitir a quantificação da carga viral na amostra fecal analisada (Kang et al., 2005).

1.4.4 - Epidemiologia

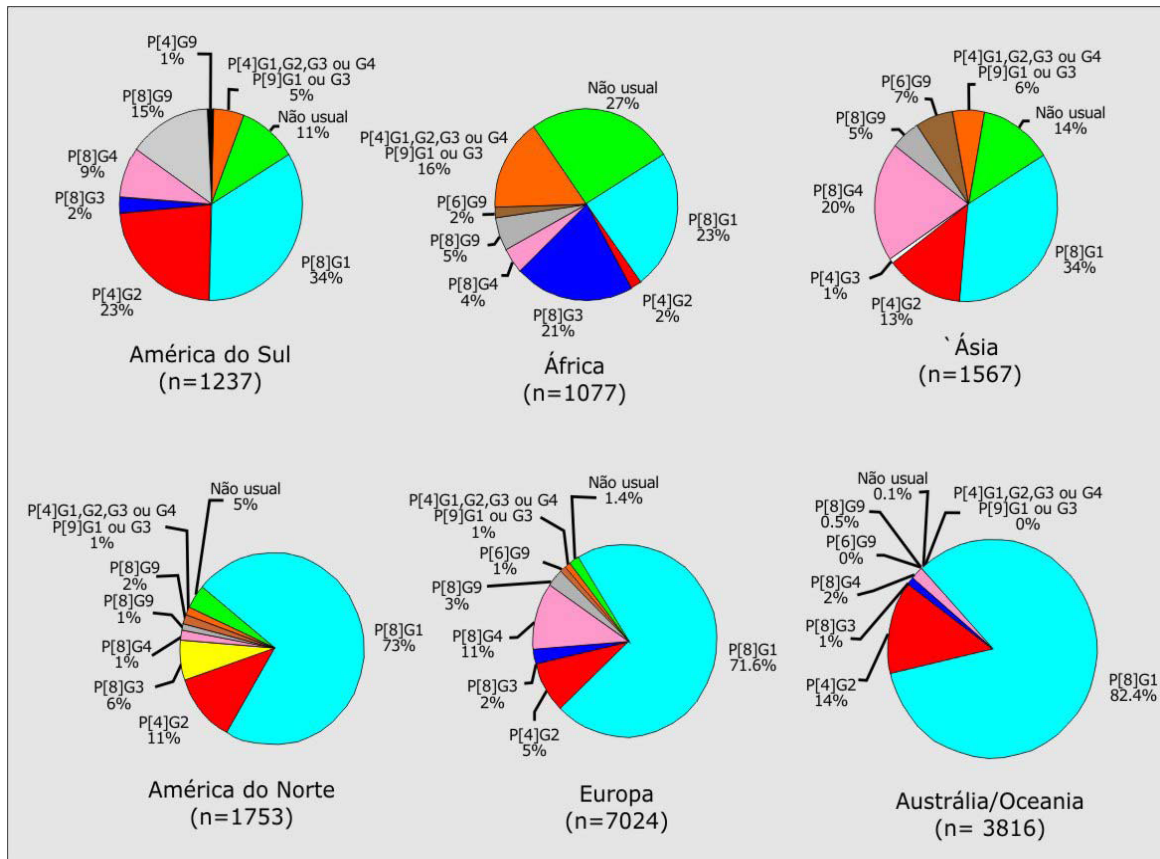
Os RV-A são considerados os principais responsáveis pela morbi-mortalidade das gastroenterites agudas em crianças em todo mundo. O impacto global causado por infecções por RV-A representa a cada ano 111 milhões de episódios diarreicos agudos, com 25 milhões de consultas, 2 milhões de hospitalizações e mais de 600.000 óbitos entre crianças com até cinco anos de idade, sendo que 85% destes

casos ocorrem em países em desenvolvimento (Parashar et al., 2006). Nos países desenvolvidos, apesar de se observar uma elevada morbidade, o número daquelas que evoluem para o óbito é limitado (Kapikian et al., 2001; Parashar et al., 2006).

Considerando-se a ampla distribuição mundial dos RV-A, o padrão de sazonalidade observado varia de região para região. Nos países que apresentam clima temperado, os grandes surtos por RV-A são observados nos meses mais frios e secos do ano, enquanto que nas regiões com clima tropical, as infecções ocorrem durante todo o ano (Kapikian et al., 2001; D'Souza et al., 2007). Os estudos epidemiológicos realizados mostram que diversos genótipos P e G podem co-circular dentro de uma mesma região e que o genótipo prevalente em uma determinada região pode mudar anualmente. Outra observação é que os genótipos prevalentes em diferentes regiões de um país podem ser distintos durante o mesmo período epidêmico (Santos & Hoshino, 2005; Gentsch et al., 2005).

Existem combinações que se repetem mundialmente e dentre as combinações mais comuns podem ser destacados cinco genótipos G (G1, G2, G3, G4 e G9) e dois genótipos P (P[4] e P[8]). Um estudo de revisão dos genótipos circulantes no mundo demonstrou que mais de 90% das infecções por RV-A na América do Norte, Europa e Austrália eram associadas a combinações dos genótipos P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8] G4. Na América do Sul e Ásia, elas representaram 68% e na África 50%. A combinação P[8]G1 ocorreu em mais de 70% das infecções na América do Norte, Europa e Austrália, e em 34% e 23% das infecções na América do Sul e na África, respectivamente (Figura 6) (Santos & Hoshino, 2005).

Figura 6 – Distribuição continental/subcontinental do grupo A de RV humano com as combinações binárias G e P.



* Santos & Hoshino (2005)

1.5 - OS ASTROVÍRUS

1.5.1 - Classificação e estrutura

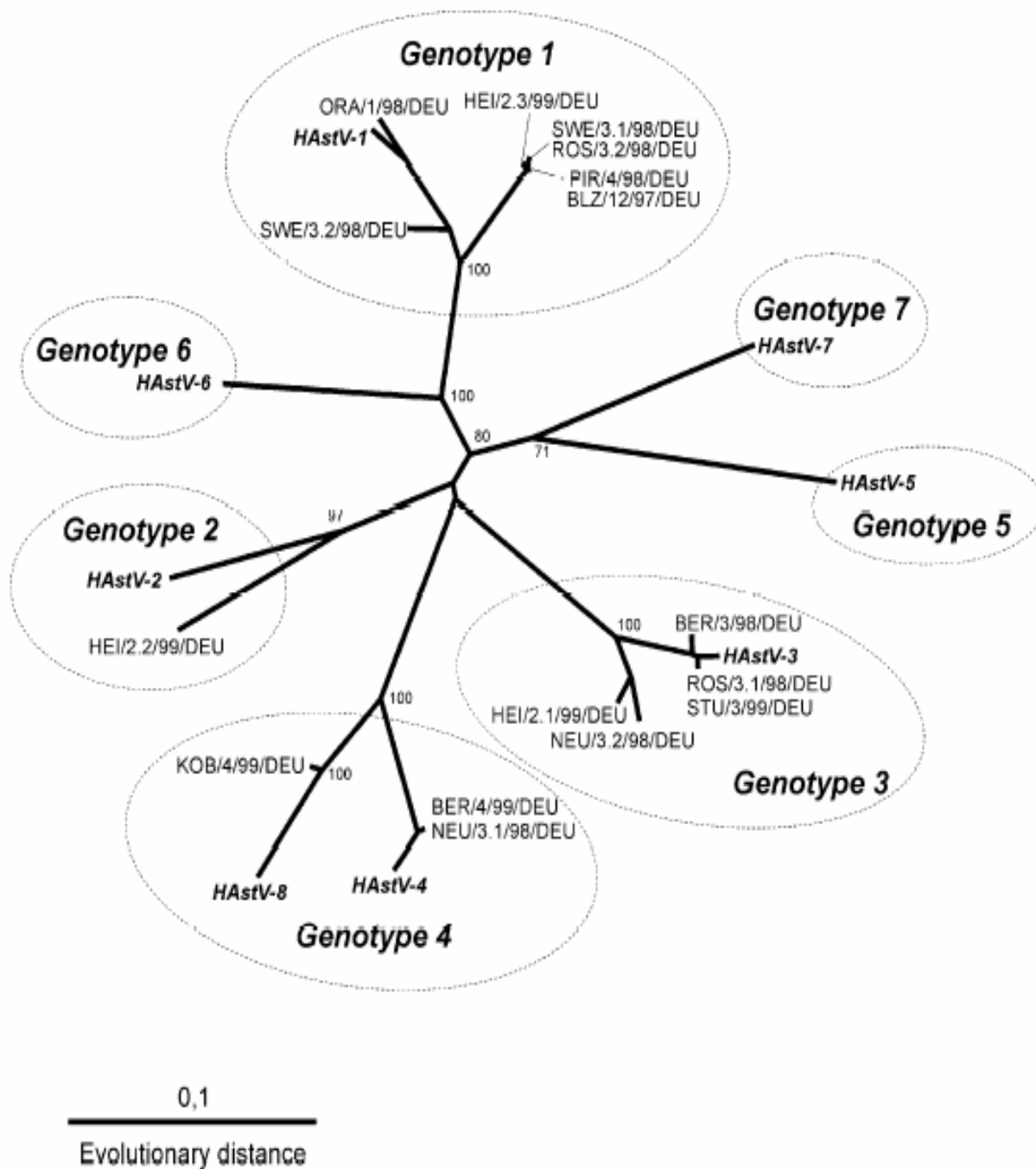
Os HAstV pertencem a família *Astroviridae* que é constituída por dois gêneros: *Mamastrovirus* (astrovírus de mamíferos) e *Avastrovirus* (astrovírus de aves). O gênero *Mamastrovirus* inclui os astrovírus que infectam o homem, os astrovírus humanos (HAstV), que podem ser classificados de acordo com a ordem

de descrição segundo o sorotipo (HAstV1 a 8), baseado na reatividade de anticorpos mono e policlonais com proteínas capsídicas, ou ainda através da identificação do genótipo de acordo com a seqüência nucleotídica de uma região localizada na ORF2 (Figura 7) (Oh & Schreier, 2001).

Existe uma correlação entre os genótipos e os sorotipos e, de acordo com análises filogenéticas do genoma, os oito sorotipos de HAstV podem ser classificados em oito genótipos correlacionados aos sorotipos, sendo que os HAstV 4 e 8 foram agrupados como pertencentes ao mesmo genótipo 4 (Figura 7) (Oh & Schreier, 2001).

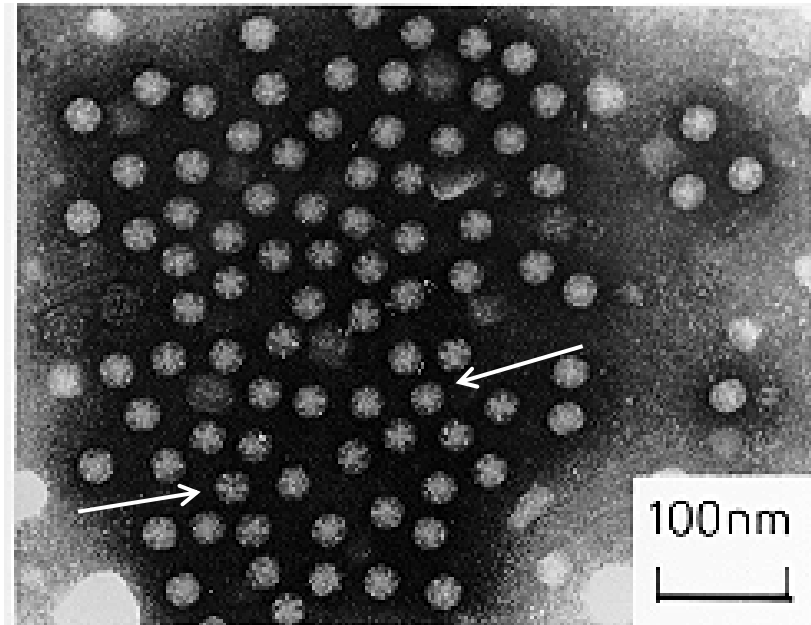
A partícula viral infecciosa do HAstV mede 70 a 90nm de diâmetro. Os HAstV são vírus pequenos e arredondados, não possuem envelope e exibem capsídeo com simetria icosaédrica composto por, pelo menos, três proteínas de 22 kDa a 35 kDa (Figura 8) (Matsui & Greenberg, 2001).

Figura 7- Árvore filogenética dos HAstV baseada na seqüência da fase aberta de leitura 2 (ORF2).



O comprimento dos ramos é proporcional à distância evolutiva entre as seqüências. A escala representa as substituições nucleotídicas por sítio (Adaptado de Oh & Schreier, 2001).

Figura 8- Morfologia do astrovírus. Micrografia eletrônica das partículas de astrovírus, algumas com aspecto estelar.



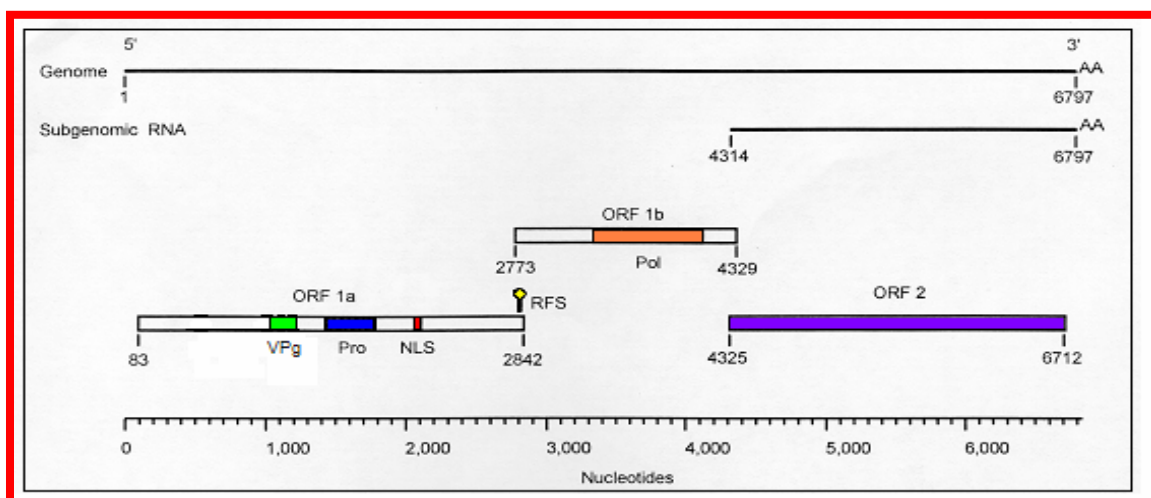
Cortesia de C. Humphrey, CDC, EUA

O genoma é constituído por uma molécula de RNA de fita simples (ssRNA), com polaridade positiva e aproximadamente 6800 nucleotídeos, sendo composto de 30% de adenina (A), 22% de citosina (C), 23% de guanidina (G), 25% de uracila (U), além de extremidades não codificantes 3' e 5'. Na extremidade 3' existe uma cauda poli (A), contendo 31 adeninas (A) (Matsui & Greenberg, 2001).

O genoma viral se apresenta organizado em três ORF, denominadas ORF1a e ORF1b, que estão localizadas próximas à extremidade 5' e codificam proteínas não estruturais, isto é, as polimerases e as proteases (NSP1a e NSPa/b), e a ORF2, que está localizada próxima à região 3' do genoma e codifica as proteínas estruturais, precursoras do capsídeo viral (VP2) (Jiang et al., 1993).

O produto da tradução da ORF1a é chamado de proteína não estrutural 1a (NSP1a), com massa molecular de 103 kDa, enquanto que o produto da tradução da ORF1b é uma proteína de fusão (NSP1a/1b) de 160 kDa. Ambas são processadas proteoliticamente para gerar as proteínas virais implicadas na replicação do genoma viral (Geigenmuller et al., 2002).

Figura 9 - Organização do genoma dos astrovírus humano.



ORF 1a e 1b região que codifica para as proteínas não estruturais e ORF 2 que codifica as proteínas precursoras do capsídeo viral (proteínas estruturais) (Jiang et al., 1993).

1.5.2 - Patogênese e manifestações clínicas

Os HAstV são adquiridos pela rota fecal-oral. Por ser agente de fácil disseminação, devem ser consideradas várias fontes de infecção como água destinada ao consumo humano, água de piscinas, rios, alimentos marinhos e principalmente pelo contato pessoa-pessoa em ambientes fechados como creches e asilos (Leite et al., 1991; Matsui & Greenberg, 2001; Maunula et al., 2004).

A patogênese da infecção pelos HAstV é pouco conhecida. Estudos demonstram a infecção de enterócitos maduros nos dois terços apicais das vilosidades e em macrófagos subepiteliais. As células intestinais infectadas apresentam agregados de partículas nas microvilosidades ou em lisossomos e desenvolvem vacúolos onde ocorre a replicação viral. Já foi identificada a presença de partículas virais no epitélio de biópsia duodenal e em macrófagos da lâmina própria de indivíduos com infecção sintomática pelos vírus (Mitchell, 2002).

O período de incubação dos HAstV varia de um a quatro dias após à ingestão de partículas infecciosas. A infecção produzida por estes vírus induz, na maioria das vezes, a uma diarreia aquosa e moderada, que dura de dois a três dias e pode vir associada a episódios de vômitos, febre, anorexia, dor abdominal entre outros sinais e sintomas (Maldonado et al., 1998; Matsui & Greenberg, 2001; Walter & Mitchiel, 2003).

A gravidade da infecção pelos HAstV é considerada menor em relação aos outros agentes entéricos, como os RV-A e os NoV, porém o quadro clínico pode ser agravado quando associado ao uso contínuo de antibióticos ou ainda por infecção mista ou imunodeficiência. (Matsui & Greenberg, 2001).

1.5.3 - Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial dos HAstV baseia-se principalmente na detecção do vírus nas fezes, devido à grande quantidade de partículas excretadas durante o processo de infecção. A técnica de ME foi o primeiro método utilizado para identificação do vírus e durante muito tempo era a única forma de detecção dos HAstV (Madley & Cosgrove, 1975). A técnica de IME é utilizada em pesquisa quando a excreção de partículas virais é baixa ou quando se pretende avaliar a resposta imunológica aos HAstV. Ambos os métodos possuem sensibilidade limitada, mas permitem a visualização das partículas virais e a detecção de co-infecção (Herrmann et al., 1990; Matsui & Greenberg, 2001).

A propagação do HAstV em culturas de células permitiu o desenvolvimento de EIE e imunofluorescência (IF). O EIE detecta tanto antígenos virais quanto anticorpos, utilizando anticorpos policlonais ou monoclonais grupo específicos e a IF é utilizada em pesquisa de diferentes sorotipos do HAstV (Matsui & Greenberg, 2001).

Outros métodos também podem ser aplicados para pesquisa dos HAstV como aglutinação em látex, cultivo celular para isolamento viral, além das técnicas moleculares como amplificação baseada na seqüência do ácido nucléico (NASBA), RT-PCR, nested-RT-PCR, PCR em tempo real e seqüenciamento de nucleotídeos (Noel et al., 1995; Sakamoto et al., 2000, Walter & Mitchell, 2003; Guix et al., 2005).

A técnica de RT-PCR vem sendo utilizada em amostras de fezes, tanto para detecção como para caracterização molecular dos oito genótipos conhecidos do HAstV, e tem demonstrado ser mais sensível que o EIE (Walter & Mitchell., 2003).

Atualmente, a técnica do PCR em tempo real é utilizada como método de detecção capaz de estimar a carga viral em amostras clínicas, demonstrando maior sensibilidade se comparada à RT-PCR (Guix et al., 2005; Royuela et al., 2006).

1.5.4 - Epidemiologia

Os HAstV são considerados importantes agentes etiológicos da gastroenterite infantil. Possuem distribuição mundial e, depois dos RV-A, são reconhecidos como a segunda causa mais comum de gastroenterite viral em lactentes e crianças hospitalizadas.

A distribuição etária da infecção por HAstV varia de acordo com a localização geográfica e as condições demográficas da população (Walter & Mitchell, 2003). Geralmente, as crianças abaixo de cinco anos de idade são as mais afetadas, conforme demonstrado em um estudo de soroprevalência realizado nos Estados Unidos, onde até 90% das crianças nesta faixa etária já tinham sido infectadas pelo HAstV (Mitchell, 2002).

Vários surtos de diarreia aguda descritos em creches, escolas primárias e em ambientes hospitalares têm sido associados a estes agentes em diversas partes do

mundo (Leite et al.,1991; Lopez et al., 2000; Silva et al., 2001; Walter & Mitchiel, 2003; Victoria et al., 2007b).

Estudos epidemiológicos realizados em diferentes países têm demonstrado que a prevalência desses vírus entre crianças varia de 2% a 11% nos países desenvolvidos, e de 2% a 26% naqueles em desenvolvimento (Leite et al.,1991; Lew et al., 1991; Lopez et al., 2000; Cunliffe et al., 2002).

A sazonalidade das infecções pelo HAstV descrita na literatura é bastante controversa e parece variar de acordo com a região geográfica analisada (Walter & Mitchiell, 2003). Existem relatos de países da Europa e Austrália, onde há aumento da incidência das infecções nos meses mais frios do ano (Guix et al., 2002; Marie-Cardine et al., 2002), assim como estudos relatando incidências maiores nos meses mais quentes, como no Egito (Naficy et al., 2000). No Brasil, em um estudo feito em Goiânia, o aumento na incidência das infecções pelo HAstV foi associado aos meses de maiores índices pluviométricos (Cardoso et al., 2002).

2- RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A gastroenterite aguda tem sido descrita como importante causa de morbidade e mortalidade infantil, especialmente em países em desenvolvimento, onde estas manifestações representam a segunda causa mais comum de morte em crianças menores de cinco anos de idade (Bryce et al., 2005; Charles et al., 2006; Sdiri-Loulizi et al., 2008)

Entre os diversos enteropatógenos virais associados às diarreias agudas, os RV-A são reconhecidos como os principais agentes etiológicos responsáveis pelos episódios de gastroenterites de maior gravidade. Outros vírus como os NoV e os HAstV, são também descritos como importantes agentes etiológicos das gastroenterites agudas (Akihara et al., 2005), o que indica a necessidade da adoção de medidas preventivas contra esses agentes. Junto com essas medidas, o conhecimento da prevalência da infecção por esses vírus na população humana, além da investigação do genótipo circulante, é importante especialmente após a introdução da vacina contra rotavírus no programa nacional de imunização.

Na cidade de Salvador, foi implantado o “Programa de Saneamento Ambiental da Baía de Todos os Santos”, que é um projeto que estuda o impacto do saneamento básico na redução de uma série de doenças infecciosas, entre elas, as de transmissão por via fecal-oral, além de analisar a repercussão das doenças diarreicas no desenvolvimento físico e mental da criança.

O estudo de detecção e caracterização molecular dos principais grupos de vírus associados aos episódios de diarreia aguda faz parte de um subprojeto denominado “Agentes etiológicos envolvidos na diarreia infantil em um centro

urbano: ocorrência, identificação e caracterização antigênica e molecular”, que está sendo realizado em colaboração com o Instituto de Saúde Coletiva – Universidade Federal da Bahia (ISC-UFBA), o Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPqGM), e o Laboratório de Virologia Comparada-Laboratório de Referência Regional para Rotavíruses (LVC-LRRGV) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)-Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Já foi estabelecido a prevalência de EAdV, RV-A e HAstV (Barreto et al., 2006), assim como a genotipagem das amostras de EAdV (Filho et al., 2006) encontradas na população do estudo. Determinar a frequência dos NoV assim como caracterizar os diferentes genótipos de RV-A, HAstV e NoV na mesma amostragem é importante para se estabelecer a circulação dos principais vírus associados a casos de gastroenterite aguda em crianças menores de três anos de idade. No Brasil o papel do RV-A como agente causal de gastroenterite está bem estabelecido, porém relatos da associação dos NoV e HAstV ainda são limitados, principalmente na Bahia, onde existem poucos estudos sobre a relevância epidemiológica dos diferentes genótipos circulando em comunidades.

3- OBJETIVOS

3.1- Geral

- Determinar a ocorrência da infecção pelos calicivírus humanos (norovírus e saporovírus) e identificar os genótipos de norovírus e outros vírus entéricos (rotavírus e astrovírus) em crianças com gastroenterite aguda participantes de um estudo longitudinal em áreas carentes da cidade de Salvador, Bahia.

3.2 - Específicos

- Determinar a frequência da infecção pelos calicivirus Humanos, pela pesquisa do genoma viral em amostras fecais coletadas no período de julho de 2001 a janeiro de 2002 em crianças menores de três anos de idade.
- Caracterizar os genótipos circulantes dos calicivirus humanos e outros vírus entéricos (rotavírus e astrovírus humanos) na população de estudo pelas técnicas de seqüenciamento de nucleotídeos e RT-PCR, respectivamente.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- MATERIAL

4.1.1 - Caracterização da população do estudo

Este estudo faz parte do Projeto Pronex 661086/1998-4: “Diarréia infantil: epidemiologia ambiental e molecular e repercussões no desenvolvimento físico e mental” e tem origem no Programa Integrado de Pesquisa em Doenças Infecciosas e Deficiências Nutricionais do ISC-UFBA que, com suporte da Secretaria de Recursos Hídricos Saneamento e Habitação da Bahia, iniciou em 1997 o desenvolvimento de atividades de investigação sobre a situação de saúde na cidade de Salvador e os possíveis efeitos das intervenções sanitárias em curso.

O projeto inicial deu origem a sete sub-projetos, dentre eles o subprojeto 3; “Agentes etiológicos envolvidos na diarréia infantil em um centro urbano: ocorrência, identificação e caracterização antigênica e molecular”, que tem como objetivo principal identificar os efeitos da ampliação de um sistema de esgotamento sanitário de uma cidade na prevalência de diferentes agentes etiológicos presentes e a associação destes aos episódios de diarréia infantil aguda, além de caracterizar geneticamente os agentes identificados.

O subprojeto 3 está sendo desenvolvido em colaboração com o ISC-UFBA, o CPqGM e o LVC-LRRGV, tendo sido aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFBA, pelo parecer nº 037/CEP-ISC-016-03.

Através de informações censitárias do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), base 1992, a cidade de Salvador foi dividida em 21 subpopulações, denominadas de “áreas sentinelas”, com características semelhantes de condições de saneamento e de renda familiar (Strina et al., 2003). Os domicílios, situados em áreas carentes no entorno da Baía de todos os Santos, com crianças em idade pré-escolar, ou seja, abaixo de três anos de idade, foram identificados e uma amostra aleatória de 1233 crianças foi selecionada e incluída no estudo.

O monitoramento das crianças foi conduzido durante 66 semanas (30/10/2000 a 31/01/2002). As visitas aos domicílios aconteciam duas vezes por semana (intervalo de 72 a 96 horas). A mãe ou a pessoa responsável pela criança era questionada sobre a ocorrência de diarreia e outros sintomas associados e se foi aplicado algum tipo de tratamento durante o episódio de diarreia.

Nesse estudo adotou-se como definição de diarreia a ocorrência de três ou mais dejeções líquidas ou amolecidas ou uma ou mais dejeções com sangue em um período de 24 horas, isto é, do momento em que a criança acordava um dia até a hora em que acordava no dia seguinte. Considerava-se terminado o episódio quando eram constatados três ou mais dias sem diarreia (Strina et al., 2003).

O período de coleta das amostras de fezes ocorreu durante seis meses (24 de julho de 2001 a 31 de janeiro de 2002). A mãe ou o responsável por cuidar da criança recebeu um recipiente para coletar as fezes (potes plásticos para análise viral, potes com meio de cultura Cary-Blair, sacos plásticos e fraldas descartáveis (para análise bacteriológica e parasitológica), um cartão com o número de identificação da criança e o número do telefone do ISC-UFBA.

Os responsáveis foram instruídos a coletar amostras de fezes de suas crianças em qualquer dia em que a criança apresentasse fezes amolecidas ou líquidas, independentemente do dia da visita domiciliar, solicitando a coleta do material através de ligação telefônica, onde um técnico era enviado ao domicílio para recolher a amostra, ou ainda levando a criança com diarreia diretamente ao ambulatório do ISC-UFBA.

As fezes coletadas eram guardadas a 4°C e encaminhadas aos laboratórios para os seguintes diagnósticos: *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Aeromonas sp.*,

Yersinia enterocolitica, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni-coli*, RV- A, EAdV, HAstV e NoV.

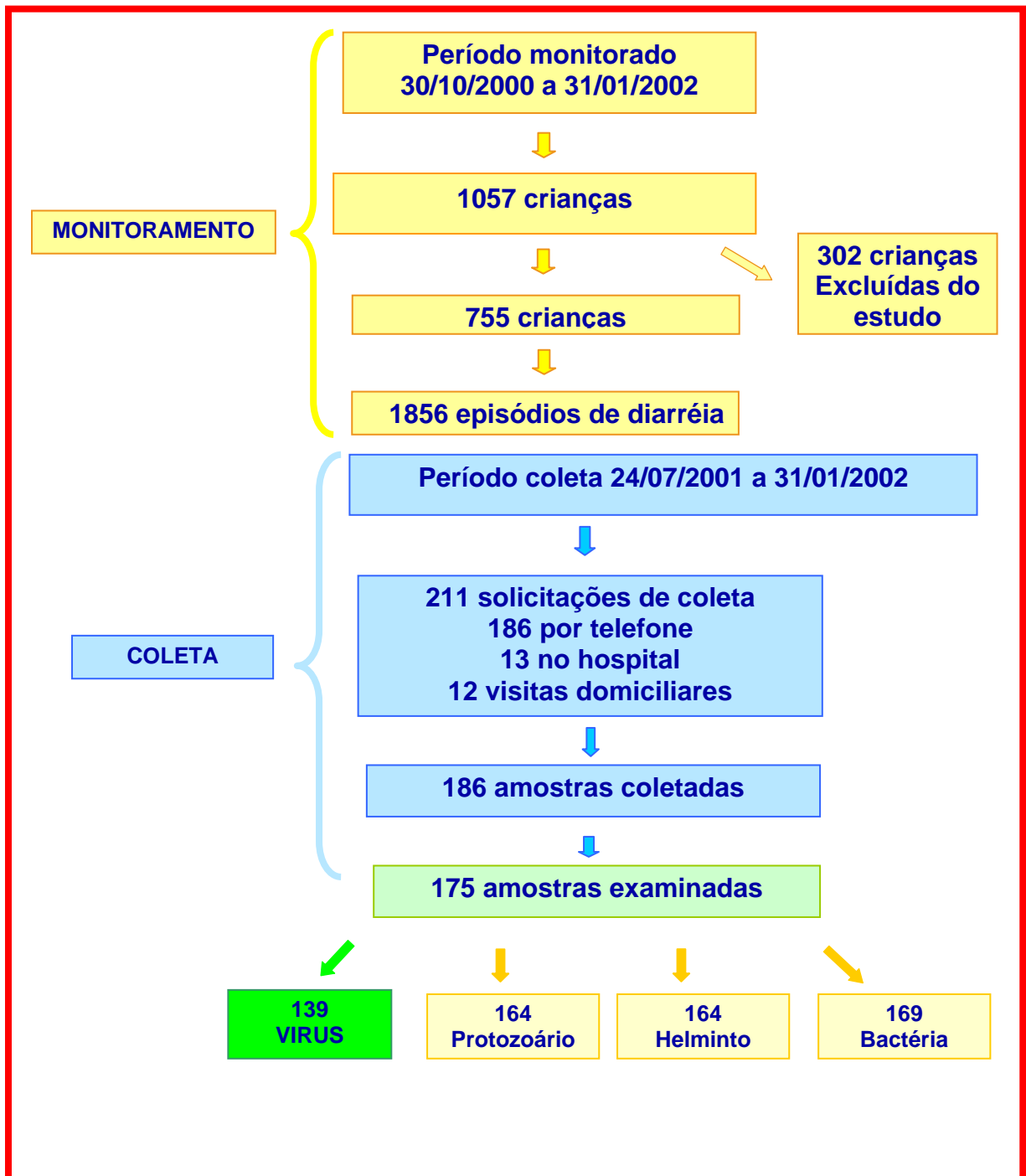
Durante o período de monitoramento, 1057 crianças foram notificadas por apresentarem quadro de diarreia, destas, trezentos e duas foram excluídas por não atenderem aos critérios de inclusão do estudo (29% do total), restando um total de 755 crianças que notificaram um total de 1856 episódios de diarreia (Figura 10).

A coleta das amostras ocorreu efetivamente durante um período de seis meses (24 de julho de 2001 a 31 de janeiro de 2002), onde foi coletado amostras em 211 dos episódios notificados (17%). Essas amostras foram provenientes de 176 crianças, onde 150 solicitaram coleta somente uma vez e 26 mais de uma vez.

Das 211 solicitações de coleta feitas pela mãe ou pelo responsável, 186 foram feitas através de ligação telefônica para o ISC-UFBA, 13 durante visitas ao ambulatório do ISC/UFBA e 12 durante as visitas domiciliares que aconteciam duas vezes por semana. Dessas 211 solicitações de coleta, 186 (91%) amostras foram coletadas: 173 amostras foram coletadas no domicílio (93%; 173/186) e 13 (7%; 13/186) foram coletadas de *swab* retal no ambulatório do ISC/UFBA.

Das 186 amostras de fezes coletadas, 175 foram enviadas para os seguintes testes: 139 amostras para diagnóstico virológico, 164 para diagnóstico de protozoários, 164 para diagnóstico de helmintos e 169 para diagnóstico bacteriano (Barreto et al., 2006). Onze amostras não foram utilizadas porque os pacientes não preenchiam os critérios definidos no estudo para diarreia.

Figura 10 - Fluxograma do monitoramento da população do estudo.



Fluxograma mostrando as etapas realizadas desde o monitoramento da população do estudo até o envio para análise laboratorial das amostras.

4.1.2 - Amostras clínicas

O material enviado para diagnóstico viral consistiu de um total de 139 amostras fecais, provenientes de 136 crianças com diarreia aguda. Essas amostras chegaram ao LVC-LRRGV em potes plásticos sob refrigeração e devidamente identificadas. Foram incluídas no banco de dados (MS-ACCESS) do laboratório e estocadas a 2-8 °C para posterior análise viral.

As amostras enviadas não vieram acompanhadas das fichas de informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes, porém estes dados estavam registrados na Coodenação do ISC-UFBA.

4.1.3 - Amostras controles

Amostras padrões de NoV, gentilmente cedidas pelo Dr. Chris Gallimore, do “Enteric, Respiratory and Neurological Virus Laboratory – Health Protection Agency”, Colindale – Reino Unido, amostras padrões de HAstV gentilmente cedidas pelo Dr. Roger Glass, do “Viral Gastroenteritis Section”, CDC, Atlanta, EUA, e amostras fecais previamente analisadas e caracterizadas geneticamente como RV-A no LVC-LRRGV foram utilizadas como controles positivos nas respectivas reações de RT-PCR. Como controle negativo, foi utilizado água livre de endo e exonucleases (Invitrogen®).

4.1.4 - Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações em cadeia pela polimerase, a localização desses iniciadores no genoma e número de pares de bases dos amplicons gerados pela técnica, estão listados nas seguintes tabelas de acordo com o vírus estudado: NoV (Tabela 1), HuCV (Tabela 2), RV-A (Tabela 3) e HAstV (Tabela 4 e 5).

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia pela polimerase para detecção e genotipagem do norovírus GI e GII*.

Oligonucleotídeos	Seqüência 5' → 3'	Região e posição no genoma	Amplicons (pb)
Mon 432 ^a (+)	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	ORF1 (5093-5112)	213
Mon 434 ^a (-)	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	ORF1 (5285-5305)	
Mon 431 ^b (+)	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	ORF1 (5093-5112)	
Mon 433 ^b (-)	GGA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	ORF1 (5285-5305)	

* Beuret et al. (2002)

^a Genogrupo I; ^b Genogrupo II; I: inosina; R: purina (A/G); Y: pirimidina (C/T); S: C/G.

Tabela 2- Oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia pela polimerase para detecção dos calicivírus (norovírus e sapovirus) *.

Oligonucleotídeos	Seqüência 5' → 3'	Região e posição no genoma	Amplicons (pb)
290	GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC		319 NoV
289	TGACAATGTAATTCATCACCATA	ORF1 (4568-1547)	331SaV

*Jiang et al. (1999)

Tabela 3- Oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia pela polimerase para genotipagem de rotavírus do grupo-A*.

Oligonucleotídeos	Seqüência 5' → 3'	Região e posição no genoma	Amplicons (pb)
G tipo 9con1	TAG CTC CTT TTA ATG TAT GG	VP7 (37-56)	
G tipo 9con2	GTA TAA AAT ACT TGC CAC CA	VP7 (922-941)	904
P tipo 4con3	CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC	VP4 (11-32)	
P tipo 4con2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	VP4 (4887-868)	876
9T1-1 G1	TCT TGT CAA AGC AAA TAA TG	VP7 (176-195)	158
9T1-2 G2	GTT AGA AAT GAT TCT CCA CT	VP7 (262-281)	244
9T3-P G3	GTC CAG TTG CAG TGT TAG C	VP7 (484-503)	466
9T4- G4	GGG TCG ATC GAA AAT TCT	VP7 (423-440)	403
9T9-B G9	TAT AAA GTC ATT GCA C	VP7 (131-147)	110
FT5- G5	CAT GTA CTC GTT GTT ACG TC	VP7 (760-779)	742
1T1 P[8]	TCT ACT TGG GAT AAC GTG C	VP4 (339-356)	345
2T1 P[4]	CTA TTG TTA GAG GTT AGA GTC	VP4 (474-494)	483
3T1 P[6]	TGT TGA TTA GTT GGA TTC AA	VP4 (259-278)	267
4T1 P[9]	TGA GAC ATG CAA TTG GAC	VP4 (385-402)	391

*Gentsch et al. (1992); Das et al. (1994)

Tabela 4- Oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia pela polimerase para genotipagem dos astrovírus*.

Oligonucleotídeos	Seqüência 5' → 3'	Região e posição no genoma
PreCap1 (+)	GGA CTG CAA AGC AGC TTC GTG	ORF2 (82-62)
12GR (-)	TTT TTT TTT TTT TTT TTT GC	ORF2 (2454-2473)

*Sakamoto et al. (2000).

Tabela 5- Oligonucleotídeos utilizados na Nested-PCR (multiplex RT-PCR) para genotipagem dos astrovírus 1 - 8 *.

Oligonucleotídeos	Seqüência	Região e posição no genoma	Amplicon (pb)
HAstV-1 (+)	AAC CAA GGA ATG ACA ATG AC	ORF 2 (2166-2185)	212
HAstV-2 (+)	ACC TGC GCT GAG AAA CTG	ORF 2 (2247-2264)	158
HAstV-3 (+)	CTG CTT GCA TCT GGT CTT TCA	ORF 2 (2283-2303)	119
HAstV-4 (+)	TGA TGA TGA AGA CTC TAA TAC	ORF 2 (2071-2091)	258
HAstV-5 (+)	TAG TAA CTT ATG ATA GCC	ORF 2 (2014-2031)	388
HAstV-6 (+)	TGG CCA CCC TTG TTC CTC AGA	ORF 2 (1951-1971)	427
HAstV-7 (+)	CTA GAC AAC AAC AAC CCG	ORF 2 (1842-1859)	548
HAstV-8 (+)	GGT AAG TGG TAC CTG CTA ACT AG	ORF 2 (1753-1775)	599
END (-)	TCC TAC TCG GCG TGG CCG C	ORF 2 (2377-2359)	599

*Sakamoto et al. (2000).

4.1.5- “Kits” comerciais utilizados no seqüenciamento de nucleotídeos.

Para a purificação do produto amplificado pela técnica de PCR: Kit comercial “QIAquick® PCR Purification Kit” (QIAGEN™, Valencia, CA, USA) e “QIAquick® Gel Extraction Kit” (QIAGEN™, Valencia, CA, USA).

Para o seqüenciamento direto dos produtos amplificados e purificados: kit comercial “Big Dye Terminator® v 1.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, CA, USA).

Para a purificação das reações de seqüenciamento: Colunas CENTRI-SEP (Princeton Separations, CA, USA).

4.1.6- Soluções

4.1.6.1- Tampão TRIS/HCl/Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2

Tris - hidroximetil-tris-aminometano (SIGMA [®])	1,21g
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) 0,0015M (Vetec [®])	0,02g
Água destilada q.s.p.	1000mL

Em um béquer de 2000mL foram adicionados os reagentes, homogeneizados com agitador magnético e ajustado o pH (7,2) com HCl PA (Merck[®]) antes de completar o volume final em balão volumétrico de 1000mL. A solução foi transferida para um frasco com vedação e autoclavada a 121°C por 20 minutos. Foi conservada entre 2 - 4°C.

4.1.6.2 - Sílica

Dióxido de silício (SIGMA [®])	60g
Água destilada q.s.p.	500mL

Em uma proveta de 500mL foram adicionadas água e 60g de sílica. A solução foi homogeneizada vertendo-se a proveta, deixando sedimentar por 24 horas. Por sucção foram desprezados 430mL do sobrenadante e adicionados 500mL de água destilada à sílica. Após sedimentação por 5 horas, foram desprezados 440mL do sobrenadante. O pH (2,0) foi ajustado adicionando-se 600µL de HCl 37% (Merck[®]). A solução foi separada em frascos de cor âmbar em alíquotas de 10mL, autoclavada a 121°C por 20 minutos e estocada entre 22°- 25°C.

4.1.6.3 - EDTA 0,2M pH 8,0

EDTA-ácido etilenodiamino tetracético-(SIGMA [®])	37,22mg
Água destilada q.s.p.	500mL

Em um béquer de 1000mL foram adicionados EDTA e 300mL de água destilada. Após homogeneização com agitador magnético, o pH (8,0) foi ajustado com NaOH. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 500mL e ajustado o volume final. A solução foi transferida para um frasco com tampa e conservada entre 22°- 25°C.

4.1.6.4 - Tampão L6

Isotiocianato de guanidina (Invitrogen [®])	120g
Triton X-100 (SIGMA [®])	2,6g
EDTA 0,2M pH 8,0 (SIGMA [®])	22mL
Tris-HCl 0,1M pH 6,4 (SIGMA [®]) q.s.p	100mL

Em um béquer de 250mL foram adicionados os reagentes e homogeneizados com agitador magnético. A solução foi transferida para um balão volumétrico, o volume final completado para 100mL com tris-HCl 0,1M pH 6,4 e transferido para frasco âmbar, que foi conservado entre 22°- 25°C.

4.1.6.5 - Tampão L2

Isotiocianato de guanidina (Invitrogen [®])	120g
Tris-HCl 0,1M pH 6,4 (SIGMA [®]) q.s.p.	100mL

Em um béquer de 250mL foram adicionados os reagentes e homogeneizados com agitador magnético. O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 100mL e o volume final completado. A solução final foi transferida para um frasco âmbar e conservada entre 22°- 25°C.

4.1.6.6 - Tampão tris-boro-EDTA 10X pH 8,4 (TBE)

Tris-base (Invitrogen®)	108g
Ácido bórico (Reagen®)	55g
EDTA 0,5M pH 8, 8 (Sigma®)	40mL
Água Milli-Q q.s.p.	1000mL

Em um béquer de 2000mL foram adicionados os reagentes e homogeneizados com agitador magnético. O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 1000mL, completado o volume final e transferido para um frasco com vedação. A solução final foi conservada entre 2 - 4°C.

4.1.6.7- Gel de agarose a 1,5%

Agarose (Invitrogen®)	1,2g
Tampão TBE 0,5 X pH 8,4 (Invitrogen®)	80mL

A agarose foi pesada e colocada em um erlenmeyer e adicionados 80mL de tampão TBE 0,5X. O erlenmeyer foi levado ao forno de microondas por 1 minuto (em potência alta) até que a agarose fosse dissolvida, deixando resfriar até +/- 50°C. A seguir, a agarose foi colocada na cuba de eletroforese, tendo sido evitada a formação de bolhas.

4.1.6.8 - Solução de brometo de etídio

Brometo de etídio 10mg/mL (Invitrogen®)	15µL
Água destilada	300mL

A solução de brometo de etídio foi dissolvida em água em recipiente plástico com tampa, homogeneizada suavemente, em agitador magnético e conservada entre 22°- 25°C. A incidência direta da luz foi evitada.

4.1.6.9 - Etanol 70%

Etanol puro (Merck®)	70mL
Água destilada	30mL

Em uma proveta de 100mL foram adicionados 70mL de etanol puro e o volume final completado com a água destilada para 100mL. O conteúdo foi homogeneizado por inversão, transferido para frasco com vedação e conservado entre 2 - 4°C.

4.2 - MÉTODOS

4.2.1 - Preparo das suspensões fecais a 10%

As suspensões fecais foram preparadas em capela de fluxo laminar com sistema de exaustão destinada a este procedimento.

Em tubos plásticos para centrifuga com fundo cônico de 15 ml foram

adicionados cerca de 5g de amostra fecal e 4,5mL de tampão Tris/HCl/Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2. Após homogeneização em vórtex por 10 segundos e centrifugação a 3000 x g por 10 minutos, foram coletados 4mL do sobrenadante e estocados a -20°C até o momento da análise.

4.2.2 - Extração do RNA viral pelo método da sílica (Boom et al., 1990)

Em tubo plástico tipo Eppendorf[®] de 1,5mL foram adicionados 1 mL de tampão L6 e 400µL de suspensão fecal a 10%, juntamente com 15µL de sílica. Os tubos foram submetidos à agitação constante em plataforma orbital com agitação lenta por 20 minutos, sendo posteriormente centrifugados a 16.000 x g por 20 segundos, descartando-se o sobrenadante em solução de NaOH 10N. Em cada tubo foi adicionado 1ml de tampão L2 para ressuspender o sedimento formado. Após nova precipitação por centrifugação a 16.000 x g por 20 segundos, o sobrenadante foi desprezado em solução de NaOH 10N.

Mais duas etapas de lavagens foram feitas. A primeira foi realizada adicionando-se 500 ml de etanol a 70% gelado e a segunda com 500mL de acetona PA gelada, utilizando o mesmo procedimento de homogeneização e precipitação para o tampão L2, desprezando o sobrenadante em solução de hipoclorito de sódio a 5%.

Após a última lavagem, os tubos foram incubados a 56° C por 15 minutos com as tampas abertas para completa evaporação da acetona. Após esse período, foram adicionados 50µL de água livre de endo e oxinucleases (Invitrogen[®]) em cada tubo. Os tubos foram novamente homogeneizados em vórtex por 10 segundos, incubados a 56° C por 15 minutos com as tampas fechadas. Após a centrifugação a 16.000 x g por 3 minutos, 40µL do sobrenadante contendo o RNA foram coletados cuidadosamente e transferidos para outro tubo. Em seguida este material foi encaminhado para a etapa 4.2.3.

4.2.3 - Reação de transcrição reversa (RT) para a obtenção de cDNA.

De cada amostra ou “pool” de amostras extraído foi feito a transcrição do RNA para um DNA complementar (cDNA), utilizando-se o iniciador randômico pd(N)₆ (Amersham Biosciences, USA). A reação de transcrição foi feita utilizando uma mistura de reagentes descrita na tabela 6.

Tabela 6- Mistura de reagentes utilizados na reação de transcrição reversa cDNA.

Reagente	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O livre de DNAase / RNAase (Invitrogen®)	-	22,5µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen®)	10X	5µL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen®)	2,5mM	5µL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50mM	2,5µL
RT Superscript III™ (Invitrogen®)	200U/µL	1µL
pd(N) ₆ (Amersham Biosciences®)	50 unidades (A ₂₆₀)	2µL

Em tubo plástico tipo Eppendorf® de 200µL foi adicionado 4µL de dimetil sulfóxido (DMSO) e 10µL do RNA extraído. Após a incubação a 97°C por 7 minutos para desnaturação do RNA, o tubo foi mantido em banho de gelo por 2 minutos. A seguir foram adicionados 36µL da mistura de reagentes (Tabela 6) totalizando um volume 50µL e o tubo incubado a 42° C por 1 hora e 95°C por 10 minutos. O produto foi estocado a -20°C até o momento da PCR.

4.2.4- Reação em cadeia pela polimerase para detecção molecular de calivírus humanos (norovírus e sapovírus).

Para a detecção e amplificação dos calivírus humanos foi utilizado o protocolo descrito por Jiang e colaboradores (1999), padronizado para atender às normas de qualidade do laboratório. Inicialmente foi preparada uma mistura de reagentes de acordo com a tabela 7.

Tabela 7- Reagentes utilizados na PCR para calicivírus humanos.

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (GIBCO BRL)	-	8,3μL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen®)	10X	2,5μL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen®)	2,5mM	2μL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50mM	1,5μL
Taq DNA polimerase Platinum II (Invitrogen®)	5U/μL	0,3μL
Mistura de oligonucleotídeos 289/290	200μM	0,4μL

Em um tubo plástico tipo Eppendorf® de 200μL foram adicionados 15μL da mistura de reagentes (Tabela 7) e 10μL de cDNA de cada amostra. Os tubos foram colocados em termociclador (Termocicler Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA – modelo 2400) programado para a etapa de desnaturação a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 49°C por 1 minuto e 20 segundos e extensão 72°C por 1 minuto. A última etapa é a de alongamento da

fita de DNA, à 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram estocados a 4°C até o momento da análise do produto amplificado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen®).

4.2.5- Reação em cadeia pela polimerase para detecção molecular de norovírus.

Para a detecção e amplificação do NoV foram utilizados os protocolos descritos por Beuret e colaboradores (2002), adequados para NoV GI e GII, uma vez que utilizam oligonucleotídeos capazes de amplificarem um fragmento da região conservada do gene que codifica a RpRd, denominada região B. Inicialmente foi preparada uma mistura de reagentes de acordo com o descrito na tabela 8.

Tabela 8 - Reagentes utilizados na PCR para detecção de norovírus (Região B).

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (GIBCO BRL)	-	14,1µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen®)	10X	2,5µL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen®)	2,5mM	2µL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50mM	0,8µL
Taq DNA polimerase Platinum II (Invitrogen®)	5 U/µL	0,3µL
Mistura de oligonucleotídeos região B (Mon 431 - Mon 432 - Mon 433 - Mon 434)	100µM (cada)	0,3µL
Total	-	20µL

Em um tubo plástico tipo Eppendorf[®] de 200 μ L foram adicionados 20 μ L de mistura de reagentes (Tabela 8) e 5 μ L de cDNA de cada amostra. Os tubos foram colocados em termocicladores programados para a etapa de desnaturação a 94 $^{\circ}$ C por 3 minutos, 40 ciclos de amplificação de 94 $^{\circ}$ C por 30 segundos, anelamento a 50 $^{\circ}$ C por 1 minuto e extensão a 60 $^{\circ}$ C por 1 minuto. A última etapa foi a de alongamento da fita de DNA, a 72 $^{\circ}$ C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram estocados a 4 $^{\circ}$ C até o momento da análise por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen[®]).

4.2.6 - Seqüenciamento parcial do genoma viral de norovírus e sapovírus.

Os amplicons obtidos pela PCR foram diretamente purificados utilizando o “kit” comercial “QIAquick[®] PCR Purification Kit” (QIAGEN[™], Valencia, CA, USA) ou purificado utilizando o “Kit” QIAquick[®] Gel Extraction Kit” (QIAGEN[™], Valencia, CA, USA) para purificação do DNA extraído do gel de agarose 1,5% (Invitrogen[®]), seguindo as recomendações do fabricante. Após a purificação, os amplicons foram quantificados em gel de agarose a 1,5% utilizando como padrão o “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen[®]).

Para o seqüenciamento dos produtos purificados foi utilizado o kit comercial “Big Dye Terminator[®] v 1.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems[®], CA, USA), conforme recomendado pelo fabricante (Tabela 9) e os mesmos oligonucleotídeos utilizados nas PCR.

Tabela 9- Reagentes utilizados na reação de seqüenciamento para caracterização molecular de norovírus e sapovírus.

Reagente	Volume por reação
DNA (25ng)	2-10µL
Tampão de seqüenciamento (Invitrogen [®]) (5X)	2µL
Big Dye (Invitrogen [®])	2µL
Oligonucleotídeo (10 µM): NoV GII (431/433)GI (432/434) ou SaV (289/290). Um iniciador por tubo de reação.	2µL
H ₂ O livre de DNase/RNase (GIBCO BRL) q.s.p.	10-20µL

Para a purificação das reações de seqüenciamento, foram utilizadas colunas CENTRI-SEP[®] (Princeton Separations[®], CA, USA) conforme orientação do fabricante. Foi utilizado o seqüenciador automático modelo ABI Prism 3100 (Applied Biosystems[®]).

4.2.7 - Análise filogenética das seqüências

O programa “BioEdit Sequence Alignment Editor” (Hall, 1999) foi utilizado no alinhamento das seqüências obtidas. As seqüências dos protótipos dos diferentes genótipos de NoV e outras provenientes de diferentes países do mundo foram resgatadas do “Entrez Pubmed – GenBank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar>) para análise. A análise filogenética das seqüências foi realizada utilizando o programa MEGA 2 versão 2.1 (Kumar et al., 2001) e a distância genética calculada pelo modelo Kimura 2-parâmetros, utilizando o método “neighborjoining” com “bootstrap” de 2000 réplicas.

4.2.8- Reação em cadeia pela polimerase para caracterização molecular de RV-A.

Para a genotipagem dos RV-A, foi utilizada a técnica descrita por Das e colaboradores (1994) para os genótipos G e Gentsch e colaboradores (1992) para os genótipos P, com modificações introduzidas por Leite e colaboradores (1996), Inicialmente foi preparada uma mistura de reagentes de acordo com o descrito na tabela 10.

Tabela 10- Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para genotipagem dos rotavírus do grupo-A.

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (Invitrogen [®])	-	15,6µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen [®])	10X	2,5µL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen [®])	2,5mM	2µL
MgCl ₂ (Invitrogen [®])	50mM	1,25µL
Taq DNA polimerase Platinum II (Invitrogen [®])	5U/µL	0,125µL
Conjunto de oligonucleotídeos consensuais G-tipo (9Con1+9Con2) ou P-tipo(4Con3+4Con2)	20µM (cada)	1µL
Total	-	22,5µL

Para cada PCR, foram adicionados 22,5µL da mistura da reagentes (Tabela 10) e 2,5µL de cDNA da amostra. Os tubos foram colocados em termocicladores programados para a etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de

amplificação de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos para o anelamento e 72°C por 1 minuto para a fase de extensão das fitas de DNA. A última etapa foi a de alongamento final da fita de DNA, a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados e analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen®) e encaminhados para a caracterização molecular através da reação de semi-Nested-PCR.

4.2.8.1- Semi-Nested da reação em cadeia pela polimerase para caracterização molecular de RV-A.

Para a genotipagem foram utilizados dois microtubos para cada amostra, um tubo para a caracterização do G-tipo e outro para P-tipo. Inicialmente, foi preparada uma mistura de reagentes de acordo com o descrito na tabela 11.

Tabela 11- Reagentes utilizados na semi-Nested-PCR para caracterização molecular dos rotavírus grupo A.

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (Invitrogen®)	-	17,4µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen®)	10X	2,5µL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen®)	2,5mM	2,0µL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50mM	1,0µL
Taq DNA polimerase Platinum II (Invitrogen®)	5 U/µL	0,125µL
Conjunto de oligonucleotídeos consensuais G-tipo (9 Con1) ou P-tipo(4Con3)	20µM (cada)	0,5µL
Conjunto de oligonucleotídeos específicos G-tipo (9T1-1G1, 9T1-2G2, 9T-3PG3, 9T-4G4, 9T-9BG9, FT5G5) ou P-tipo (1T1P[8], 2T1P[4], 3T1P[6], 4T1P[9]).	20µM (cada)	0,5µM

Em cada microtubo de 200µL tipo Eppendorf[®], foram adicionados 1-5µL do produto da PCR e a mistura de reagentes (Tabela 11), totalizando 25µL de volume final. Os tubos foram colocados em termocicladores programados para a etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos para a fase de anelamento e 72°C por 1 minuto para a fase de extensão das fitas de DNA. A última etapa foi a de alongamento final da fita de DNA, a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados e analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen[®]).

4.2.9- Reação de amplificação em cadeia pela polimerase, precedida de transcrição reversa para genotipagem dos astrovírus humanos.

Para genotipagem do HAstV utilizou-se um protocolo descrito por Sakamoto e colaboradores (2000), com algumas modificações descritas por Miranda (2004).

Em cada microtubo de 200µL tipo Eppendorf[®] foram adicionados 10µL do RNA extraído e submetido à temperatura de 95°C por 5 minutos, seguido de banho de gelo por mais 5 minutos para desnaturação. Foram adicionados 15 µL da mistura de reagentes para RT (Tabela 12) totalizando 25µL de volume final. A seguir, foram adicionados 25 µL da mistura de reagentes para PCR (Tabela 12), perfazendo um total de 50 µL. Os tubos foram colocados em termocicladores programados para a etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos para a fase de anelamento e 72°C por 1 minuto para a fase de extensão das fitas de DNA. A última etapa foi a de alongamento final da fita de DNA, a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados e analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen[®]).

Tabela 12- Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa para a genotipagem dos astrovírus humanos.

Reagente	Concentração	RT	PCR
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (Invitrogen [®])	-	-	19,2μL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen [®])	10X	2,5μL	2,5μL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen [®])	2,5mM	2μL	2μL
DTT	100mM	0,5μL	-
MgCl ₂ (Invitrogen [®])	50mM	0,8μL	1μL
RNAsin (Invitrogen [®])	40U/μL	0,3μL	-
Oligonucleotídeos Pré-Cap 1 (+), Iniciador 12 GR (-)	20mM (cada)	1,4μL	-
Transcriptase reversa (Super Script II)	200U/μL	0,5μL	-
Taq DNA polimerase Platinum II (Invitrogen [®])	5U/μL	-	0,3μL
Total	-	15μL	25μL

4.2.9.1 - *Nested*-PCR (multiplex RT-PCR).

Após a realização da RT-PCR, os amplicons obtidos foram submetidos a uma nova amplificação pelo método de *Nested*-PCR multiplex, utilizando os pares de oligonucleotídeos sorotipo-específicos para genotipagem dos HAstV 1-8 e END (Tabela 6).

Foram adicionados 2,5μL do produto amplificado na RT-PCR aos 47,5μL da mistura para *Nested*-PCR (Tabela 13) em um microtubo de 200μL. As etapas para amplificação e condição de termociclagem foram realizadas conforme descrito anteriormente no item 4.2.9.

Tabela 13- Reagentes utilizados na *Nested*-PCR para a genotipagem dos astrovírus humanos.

Reagentes	Concentração	PCR
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (Invitrogen [®])	-	31,6µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen [®])	10X	5µL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen [®])	2,5mM	4µL
Tampão de Reação	10 X	1,6µL
MgCl ₂ (Invitrogen [®])	50mM	1µL
Oligonucleotídeos sorotipo específico (HAstV1-8)	20mM	5µL
Iniciador END	20mM	1µL
Taq DNA polimerase Platinum II (Invitrogen [®])	5U/µL	0,3µL
Total	-	47,5µL

5 - RESULTADOS

Um total de 139 amostras fecais coletadas de crianças menores de três anos de idade e com sintomas de gastroenterite aguda, participantes de um estudo longitudinal em áreas carentes da cidade de Salvador, BA, entre 24 de junho de 2001 a 31 de janeiro de 2002, foi recebido e analisado pelo LVC-LRRGV do IOC para investigação laboratorial e identificação viral. Todas as amostras foram previamente investigadas para a presença de RV, EAdV e HAstV, e os resultados publicados segundo Barreto e colaboradores (2006).

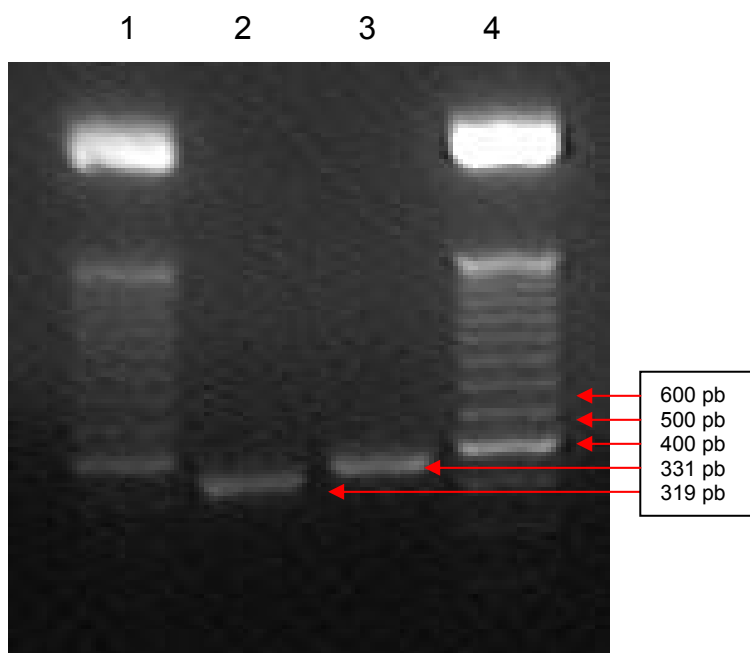
Neste estudo, todas as 139 amostras foram investigadas para a presença dos calicivírus humanos (norovírus e sapovírus) e as amostras positivas para rotavírus e astrovírus previamente identificadas, foram submetidas à genotipagem para caracterização molecular.

5.1 - PESQUISA VIRAL

5.1.1- RT-PCR utilizando oligonucleotídeos 289/290 para investigação dos calicivírus humanos.

Inicialmente, foi realizada a RT-PCR utilizando um par de oligonucleotídeos (289/290) para a amplificação de HuCV (NoV e SaV) onde os produtos obtidos geraram amplicons com bandas de DNA de 319pb para NoV e 331pb para SaV. Das 139 amostras analisadas, sete (5,0%) apresentaram amplicons específicos para HuCV. Destas, cinco amostras foram identificadas como NoV e duas como SaV, de acordo com a análise do produto amplificado em gel de agarose (Figura11).

Figura 11- Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados pela PCR utilizando oligonucleotídeos 289/290.

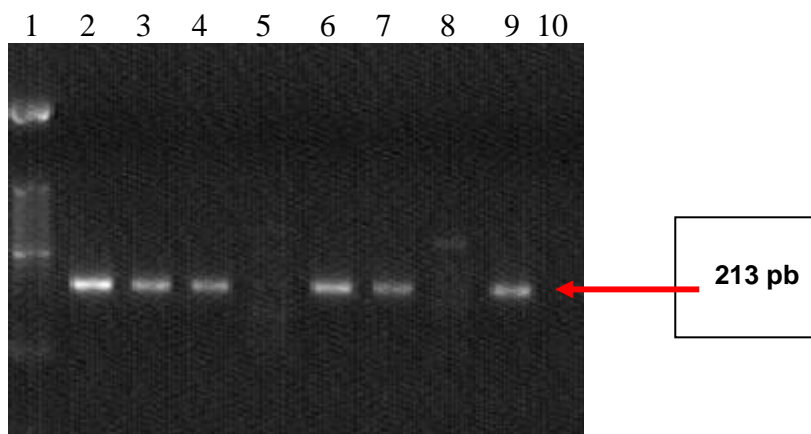


Linha 1, 4 - Marcador de massa molecular (100pb)
Linha 2 - Amostra positiva NoV
Linha 3 - Amostra positiva SaV

5.1.2- RT-PCR utilizando oligonucleotídeos Mon 431/432/433/434 para investigação dos norovírus genótipos GI e GII .

Todas as 139 amostras foram analisadas por RT-PCR utilizando dois pares de oligonucleotídeos específicos para NoV GI e GII (Mon 431/432/433/434) onde os produtos obtidos geraram fragmentos de 213pb. Onze amostras (7,9%) apresentaram resultado positivo de acordo com a análise do produto amplificado em gel de agarose (Figura12).

Figura 12- Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados por PCR utilizando oligonucleotídeos Mon 431/432/433/434.



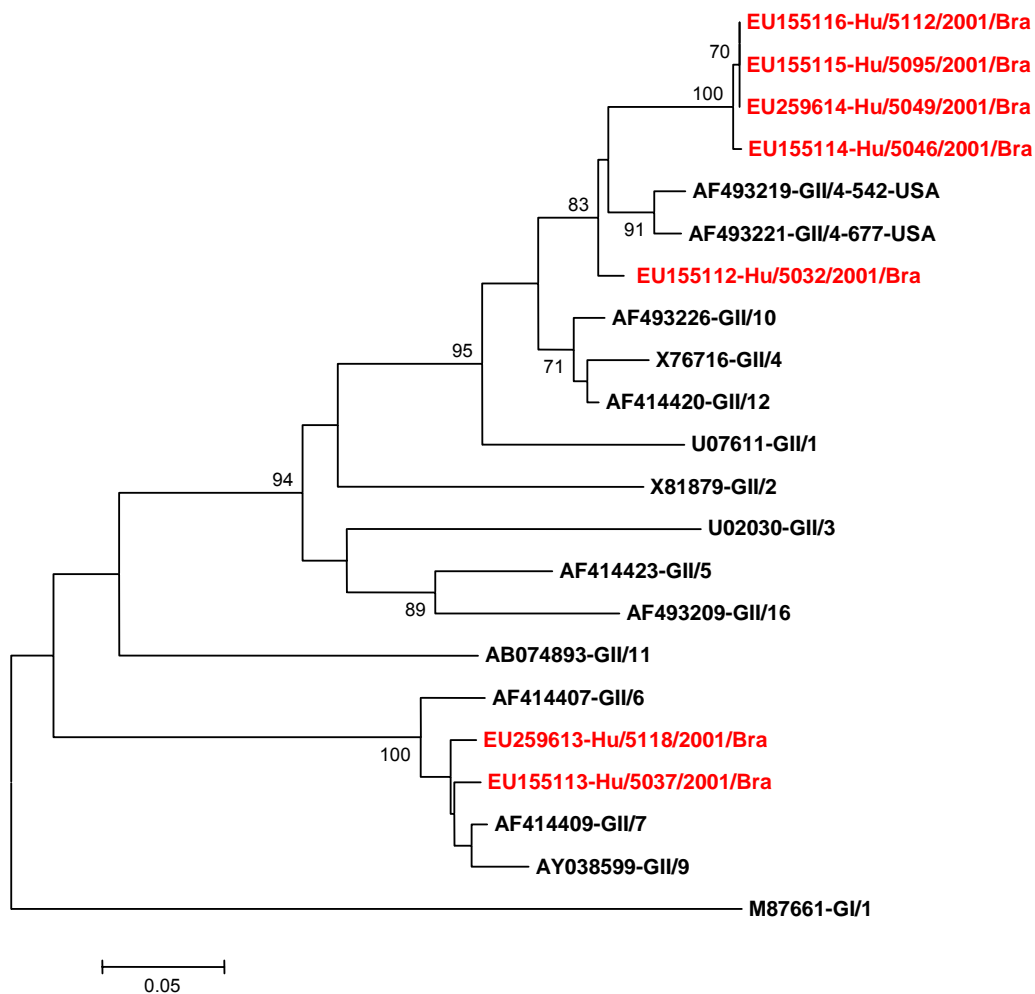
Linha 1: Marcador de peso molecular de 100 pb
Linhas 2, 3,4,6,7 e 9: Amostras positivas NoV
Linhas 5 e 8: Amostras negativas

5.2 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS NOROVÍRUS.

A genotipagem das amostras positivas para NoV foi determinada através de seqüenciamento dos produtos obtidos na RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos Mon 431/432/433/434, específicos para a região B da ORF1 do genoma do NoV. Das 11 amostras positivas, sete foram submetidas ao seqüenciamento. Não foi possível realizar o seqüenciamento das outras quatro amostras devido à perda de DNA durante o processo de purificação.

As seqüências obtidas foram depositadas no *GenBank* e comparadas com os protótipos de NoV para identificação do genogrupo. Todas as amostras submetidas ao seqüenciamento foram identificadas como pertencente ao genogrupo GII. Os números de acesso dessas seqüências no *GenBank* são: Hu/5032/2001/Bra (EU155112), Hu/5037/2001/Bra (EU155113), Hu/5046/2001/Bra (EU155114), Hu/5049/2001/Bra(EU259614), Hu/5095/2001/Bra, (EU155115) Hu/5112/2001/Bra (EU155116), Hu/5118/2001/Bra (EU259613) (Figura 13).

Figura 13- Árvore filogenética do norovírus baseada na seqüência de nucleotídeos da ORF1 (Região B).

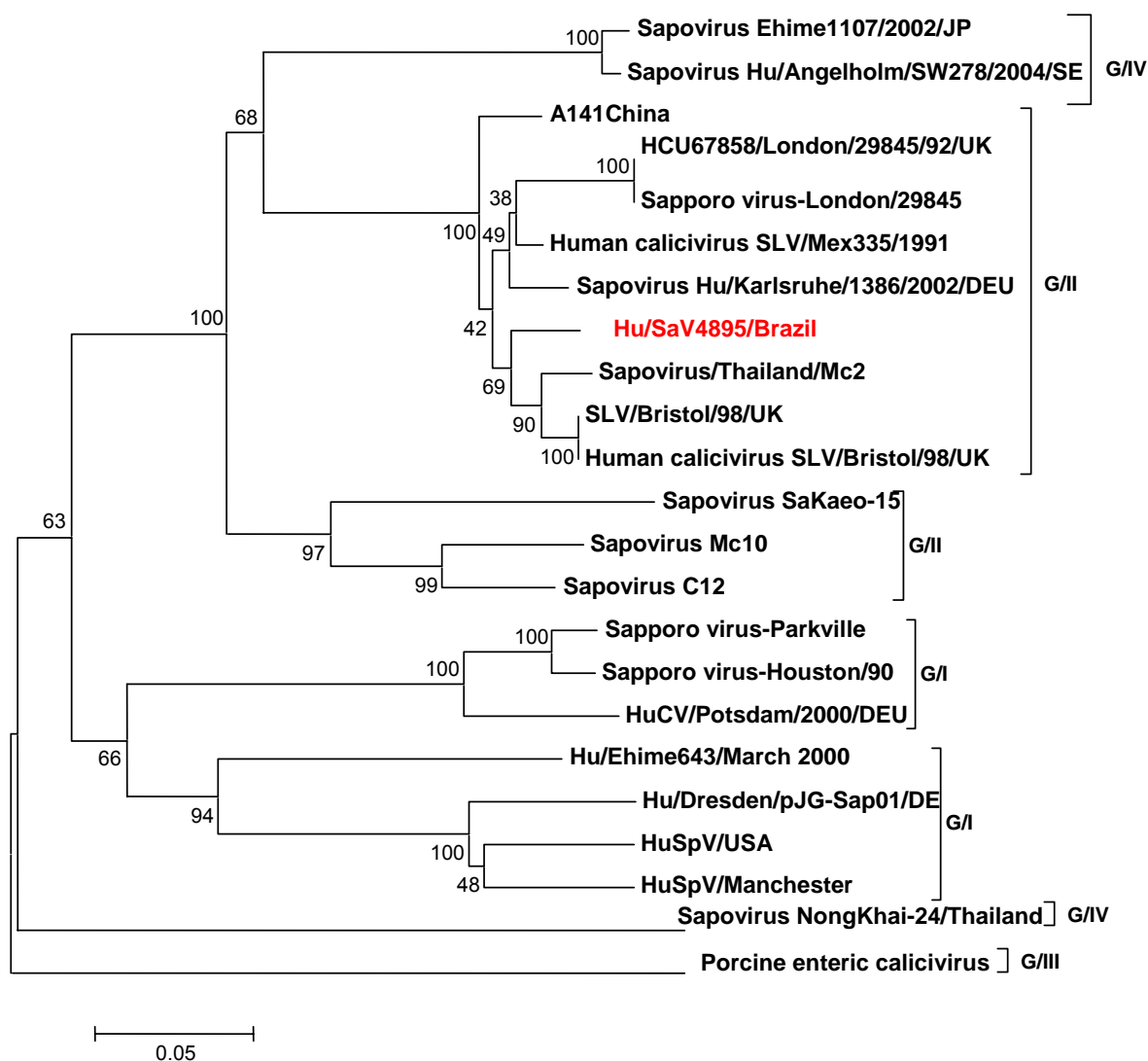


As cepas de NoV GII utilizadas como referência para comparação foram: Norwalk-Like (AF493219), Norwalk-Like (AF493221), Howard (AF493226), Bristol (X76716), Honolulu (AF414420), Hawaii (U07611), Melksham (X81879), Toronto (U02030), White River (AF414423), Gwynedd (AF414409), SW918 (AB074893), Florida (AF414407), Tiffin (AF493209), Virginia Beach (AY038599). A cepa NoV GI (M87661) foi utilizada para comparação do grupo externo.

5.3 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS SAPOVÍRUS

O seqüenciamento parcial do genoma foi realizado em uma das duas amostras positivas pela RT-PCR para SaV para a confirmação do genótipo circulante. Não foi possível realizar o seqüenciamento da outra amostra devido à perda durante o processo de purificação da banda de DNA. A análise filogenética desta amostra juntamente com os protótipos dos SaV disponíveis no GenBank identificou a amostra como genótipo GII de sapovírus humano (Hu/SaV4895/Brazil) (Figura14).

Figura 14- Árvore filogenética da amostra do sapovírus baseado na seqüência de nucleotídeos da região da polimerase.



Os grupos de sapovírus humanos utilizados como referência para comparação foram: Sapovirus Ehime1107/2002/JP (DQ 058829), Sapovirus Hu/Angelholm/SW278/2004/SE (DQ125333), A141China GII, HCU67858/London/29845/92/UK (U67858), Sapporo virus-London/29845 (U95645), Sapovirus/Thailand/Mc2 (AY237419), SLV/Bristol/98/UK (AJ249939), Sapovirus SaKaeo-15 (AY646855), Sapovirus Mc10 (CS70749), Sapovirus C12 (AY603425), Sapporo virus-Parkville (U73124), Sapporo virus-Houston/90 (U95644), HuCV/Potsdam/2000/DEU (AF294739), Hu/Ehime643/March 2000 (DQ366345), Hu/Dresden/pJG-Sap01/DE (AY694184), HuSpV/USA GI, HuSpV/Manchester GI, Sapovirus NongKhai-24/Thailand (AY646856). O grupo *porcine enteric calicivirus* GIII (EU381231) foi utilizado para comparação do grupo externo.

5.4 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ROTAVÍRUS.

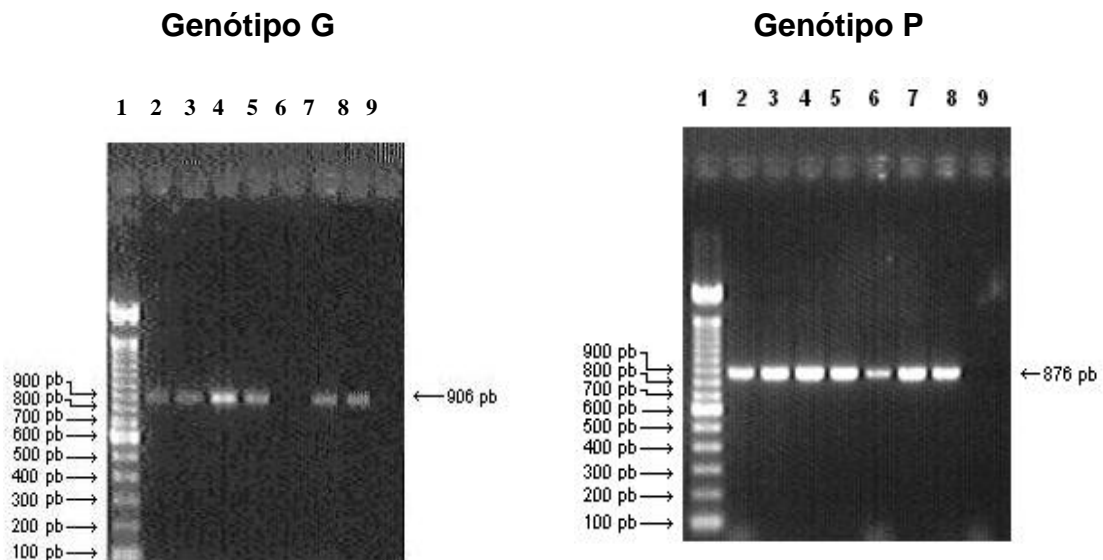
As 11 amostras positivas para RV-A foram submetidas à genotipagem através da RT-PCR para amplificação de VP7 (G-tipos) e VP4 (P-tipo), seguida de uma reação de Semi-Nested-PCR para determinar o genótipo específico para G e P.

Inicialmente, foi realizada a PCR utilizando dois pares de oligonucleotídeos (9con1/9con2) para a amplificação de VP7 (G-tipo) e VP4 (P-tipo) onde os produtos obtidos geraram fragmentos consensuais de 904 pb para G-tipo e 876pb para P-tipo.

Tanto o genótipo G quanto o genótipo P puderam ser determinados em 10 das 11 amostras positivas submetidas à genotipagem. Destas, três amostras foram caracterizadas como G1P[8] e sete como G9P[8].

Em uma amostra, apesar de apresentar reação para o par de oligonucleotídeos consensual (9con1/9con2), não foi possível determinar o genótipo específico para G e P. Os produtos da amplificação pela técnica de Semi-Nested-PCR das amostras positivas para RV-A genótipo G1P[8] e G9P[8] estão ilustradas nas Figuras 15 e 16.

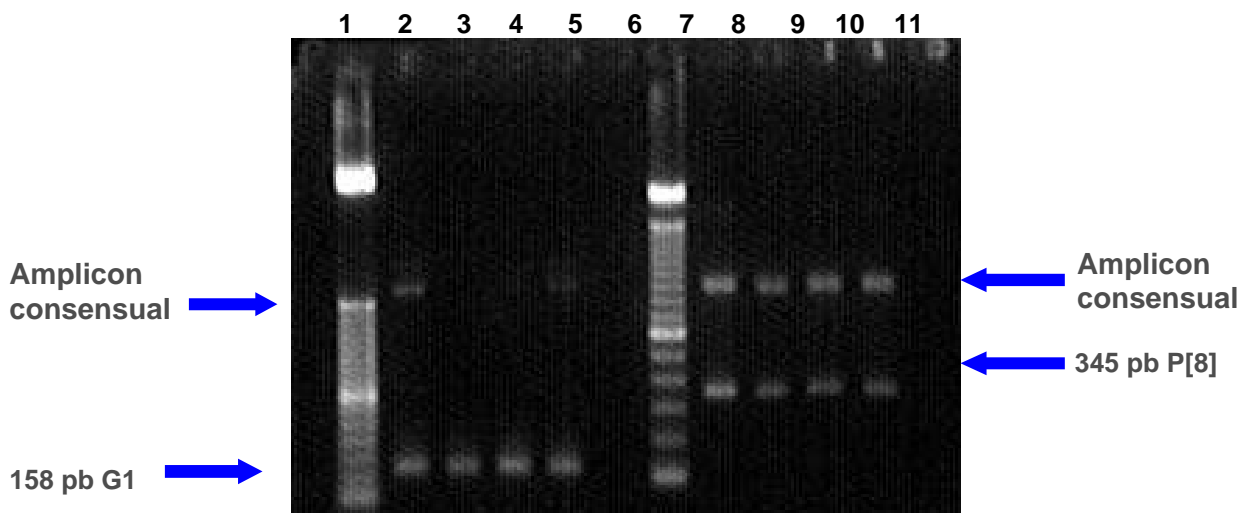
Figura 15- Eletroforese em gel de agarose dos produtos da RT-PCR para amplificação de VP7 (G-tipo) e VP4 (P-tipo) de RV.



Linha 1- Marcador de peso molecular (100pb)- linhas 2,3,4,5,7 e 8- amostras RV A positivas, linha 6- amostra RV A negativa e linha 9- controle negativo

Linha 1- Marcador de peso molecular (100pb)- linhas 2,3,4,5,6,7 e 8- amostras RV A positivas, linha 9- controle negativo

Figura 16- Eletroforese em gel de agarose dos produtos da Nested-PCR para determinar os genótipos específicos G e P do rotavírus grupo A.

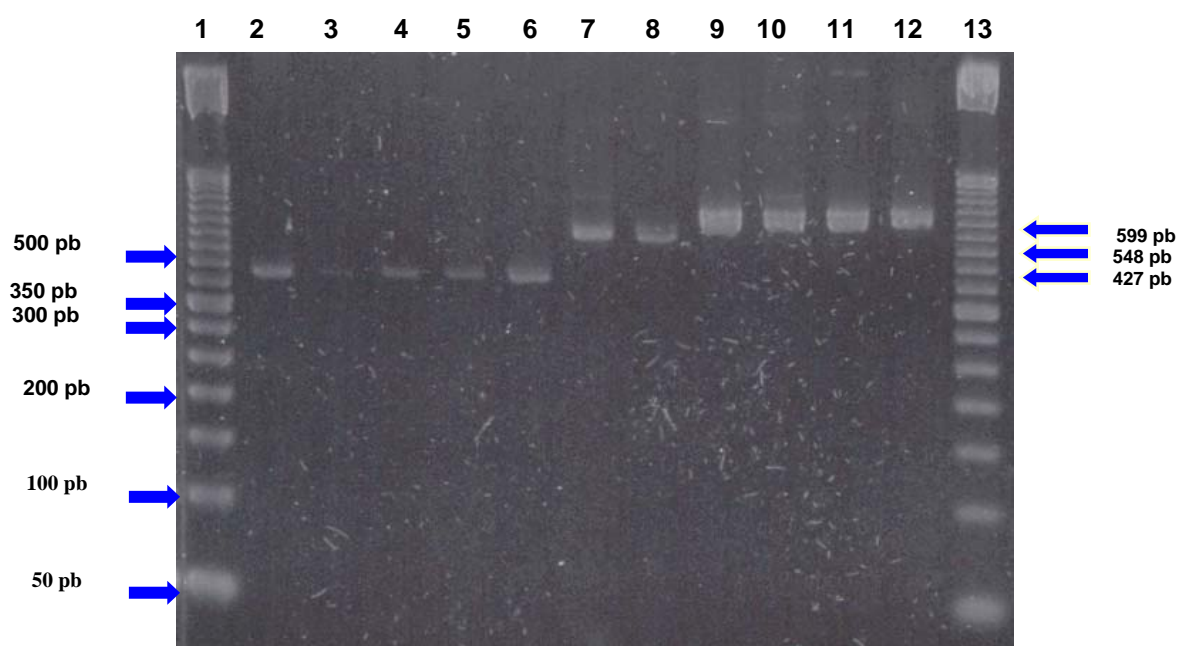


Linhas 1e 7- Marcador de massa molecular de 50 e 100 pb, respectivamente;
Linhas 2, 3, 4 e 5- Amostras de genótipo G1;
Linhas 6 e 12- Controles negativos;
Linhas 8, 9,10 e 11- Amostras de genótipo P[8].

5.5 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ASTROVÍRUS HUMANOS.

A genotipagem das HAstV foi realizada nas sete amostras positivas utilizando as técnicas de RT-PCR e Nested-PCR (multiplex RT-PCR) para a caracterização molecular dos diferentes genótipos circulantes. Foram identificadas três amostras pertencentes ao genótipo 6 (HAstV-6), uma amostra pertencente ao genótipo 7 (HAstV-7) e três amostras pertencentes ao genótipo 8 (HAstV-8) pela presença dos amplicons de 427pb, 548pb, e 599pb, respectivamente (Figura 17).

Figura 17- Eletroforese em gel de agarose dos produtos da Nested-PCR para determinar o genótipo específico de HAstV.



Linha 1 e 13: Marcador de massa molecular
Linha 2, 3, 4, 5: Amostras positivas HAstV 6
Linha 7: Amostras positivas HAstV 7
Linha 9,10,11: Amostras positivas HAstV 8
Linha 6, 8, 12: Padrão de HAstV 6; HAstV 7; HAstV 8, respectivamente.

6 - DISCUSSÃO

Neste estudo, foi investigada a frequência da infecção pelo NoV e SaV em crianças menores de três anos de idade com o quadro clínico de diarreia aguda, participantes de um estudo longitudinal em áreas carentes da cidade de Salvador, Bahia, no período de julho de 2001 a janeiro de 2002. Foi realizada, também, a caracterização molecular das amostras positivas para RV-A e HAstV, previamente testadas por Barreto e colaboradores (2006).

A ausência de um sistema de cultura de células ou modelo animal eficiente para replicação dos NoV tem limitado o desenvolvimento de estudos efetivos sobre o papel desses agentes nos episódios de gastroenterite aguda. Com o desenvolvimento de protocolos moleculares como métodos de diagnóstico e de caracterização molecular, foi possível estabelecer a importância do NoV como agente etiológico da gastroenterite aguda, tanto em casos esporádicos quanto em surtos, anteriormente limitados a pequenos estudos utilizando a ME (Estes et al., 2006; Straub et., 2007).

Inicialmente, foram testadas as 139 amostras através da RT-PCR utilizando um par de oligonucleotídeos 289/290, sendo obtido um total de sete amostras positivas (5%; 7/139). Esse par de oligonucleotídeos é capaz de detectar HuCV, tanto NoV como SaV, sendo utilizado em estudos realizados em diferentes partes do mundo (Jiang et al., 1999; Borges et al., 2006).

No Brasil, são raros os relatos sobre a ocorrência dos HuCV. Um estudo sorológico realizado por Gabbay e colaboradores (1994) em uma comunidade indígena do Amazonas demonstrou que 100% das amostras analisadas apresentavam positividade para calicivírus. Outro estudo realizado com amostras de fezes de crianças com diarreia aguda da região Centro-Oeste do Brasil, incluindo as

idades de Brasília e Goiânia, demonstrou uma prevalência de 8,6% para calicivírus (NoV e SaV), não sendo relatados os percentuais de positividade associados aos SaV e NoV (Borges et al., 2006).

O uso do par de oligonucleotídeos 289/290 possibilitou detectar duas amostras de SaV na população estudada. A análise filogenética da amostra seqüenciada foi usada para comparação com outras seqüências protótipos disponíveis no GenBank, demonstrando que a amostra brasileira agrupou com isolados do genogrupo GII do SaV.

A confirmação da circulação do SaV na população analisada sinaliza para a necessidade de futuros estudos que possam estabelecer o papel deste agente na etiologia das diarreias, principalmente infantil, considerando que no Brasil são raros os relatos que apontam a presença dos SaV nos estudos de gastroenterite.

Todas as amostras também foram analisadas por outro conjunto de oligonucleotídeos (Mon 431/432/433/434), específicos para a região da ORF1 do genoma viral do NoV, considerada uma região conservada dos NoV GI e GII (região B) (Beuret et al., 2002), sendo encontrada 11 amostras positivas (7,9%). O uso dos oligonucleotídeos específicos Mon 431/432/433/434 é descrito como capaz de identificar mais de 90% das cepas dos genogrupos NoV GI e GII (Blanton et al., 2006).

A prevalência de NoV (7,9%) encontrada neste estudo com o uso de oligonucleotídeos específicos para NoV foi igual à observada para RV-A (7,9%) por Barreto e colaboradores (2006) na mesma população. Esse fato confirma a importância dos NoV em crianças de comunidade, especialmente considerando o aumento de estudos que sugerem que os NoV representam o segundo agente etiológico de importância clínica em casos de gastroenterite aguda depois dos RV-A (Bull et al., 2006; Victoria et al., 2007a ; Kroneman et al., 2008).

No Brasil, existem poucos estudos sobre os NoV e a maioria foi realizado com amostras de fezes em casos esporádicos mostrando o envolvimento destes vírus em de 8,6% a 33% (Borges et al. 2006; Castilho et al., 2006; Soares et al., 2007; Victoria et al., 2007a) ou em amostras provenientes de surtos (Gallimore et al., 2004; Ferreira et al., 2008)

No Estado de São Paulo, Castilho e colaboradores (2006), utilizando os mesmos oligonucleotídeos do nosso estudo (região B), encontraram uma prevalência de 33% em crianças hospitalizadas menores de 3 anos de idade. Essa diferença na taxa de detecção talvez seja devido ao fato da população do nosso estudo ser de crianças de comunidade que apresentavam diarreia aguda, não contemplando as crianças assintomáticas ou com diarreia persistente, como as analisadas por esses autores.

Um estudo realizado em serviços de emergência e em ambulatórios de hospitais no Rio de Janeiro, durante o período de janeiro de 1998 a dezembro de 2005, demonstrou que o NoV estava presente em 14,5% das amostras de fezes de crianças menores de 10 anos, sendo detectados tanto o genogrupo GI (48%) quanto o genogrupo GII (52%) (Soares et al., 2007). Ainda na cidade do Rio de Janeiro, Victoria e colaboradores (2007a) detectaram NoV GI e GII em uma população pediátrica internada em hospitais públicos, sendo que o genogrupo GII foi encontrado em 96% dos casos.

Um estudo retrospectivo realizado em uma creche no Rio de Janeiro, com crianças menores de cinco anos de idade apresentando surtos de gastroenterite aguda, demonstrou que os NoV do genogrupo GII foram responsáveis por três dos quatro surtos estudados, com uma prevalência variando de 23% a 67% (Gallimore et al., 2004).

Recentemente um estudo realizado com amostras de surto envolvendo crianças e adultos, na região do médio Paraíba, no estado Rio de Janeiro, identificou o norovírus em 66% das amostras estudadas, sendo o único agente etiológico identificado (Ferreira et al., 2008).

Estudos de epidemiologia molecular têm demonstrado a grande variabilidade genética observada entre os NoV e, por esta razão, a caracterização molecular dos diferentes genótipos tem sido utilizada para o melhor entendimento da epidemiologia desse agente associado à gastroenterite aguda. O NoV tem sido identificado em diversas regiões do mundo, mas nos países em desenvolvimento a prevalência é subestimada ou desconhecida, particularmente em comunidades onde os estudos são raros.

O primeiro estudo da diversidade genética dos NoV realizada no Brasil analisou casos de gastroenterites em crianças menores de um ano de idade com ou sem diarreia e com crianças hospitalizadas com diarreia persistentes, identificando os genótipos GI e GII (Parks et al., 1999).

O seqüenciamento do fragmento obtido pelo uso do par de oligonucleotídeos (Região B) de sete das 11 amostras positivas para NoV demonstrou a circulação do genogrupo GII na população durante o período estudado. As amostras seqüenciadas foram usadas para análise filogenética, onde foram comparadas com outras seqüências protótipos disponíveis no *GenBank*, mostrando que três amostras eram idênticas entre si e todas agruparam com isolados do genogrupo GII. Este fato confirma a circulação do genogrupo GII como o genogrupo dominante em relação ao GI, descrito em diferentes partes do mundo, inclusive por estudos realizados no Brasil (Gallimore et al., 2004, Bull et al., 2006; Castilho et al., 2006; Kooperman et al., 2002; Soares et al., 2007; Victoria et al., 2007a; Ferreira et al., 2008).

A contribuição dos RV-A nos casos de gastroenterite de etiologia viral é indiscutível, representando a causa mais comum das gastroenterites graves em todos os países do mundo, sendo responsável por cerca de um terço das hospitalizações e um quarto da mortalidade por esta síndrome (Parashar et al., 2006). A epidemiologia global dos RV-A tem consistentemente mostrado que cinco G-tipo (G1-G4 e G9) e dois P-tipo (P[4] e P[8]) representam mais de 90% das cepas de importância clínica identificadas em todo o mundo, incluindo estudos realizados no Brasil (Leite et al., 1996; Santos et al., 2005; Parashar et al., 2006; Araujo et al., 2007). Outros estudos identificam genótipos não-usuais de RV em diferentes partes do mundo e que atingem importância epidemiológica em algumas áreas geográficas, como G5, G6, G8, e G10 (Cunliffe et al., 2001; Castello et al., 2004;).

Neste estudo, dez das 11 amostras positivas para RV-A, previamente testadas pela técnica de EGPA e EIERA (Barreto et al., 2006), foram estudadas para a determinação dos genótipos G e P. Três amostras foram caracterizadas como G1P[8] e sete como G9P[8]. Os resultados obtidos neste estudo correlacionam-se

com outros estudos realizados no Brasil, os quais revelam o genótipo G1P[8] como o mais frequentemente detectado e o genótipo G9 P[8] como genótipo emergente em diversas partes do país.

Leite e colaboradores (1996), em estudo com amostras brasileiras, detectaram os genótipos G1P[8], G2P[4], G3 P[8] e G4 P[8] em 67% dos casos. Por outro lado, Araújo e colaboradores (2002) também identificaram combinações usuais tais como G2P[4] em 21%, G1P[8] em 17% e G3 P[8] em 13% dos casos em amostras do Rio de Janeiro. Em Belém, Pará, foi constatado a ocorrência dos genótipos G1P[8] e G2P[4] em 53% e 27% dos casos, respectivamente, em amostras provenientes de crianças que receberam a vacina tetravalente RRV-TV (Mascarenhas et al., 2002).

Estudos mais recentes relatam a ocorrência de G1P[8] em 66,6%, G2P[4] em 1,0%, G3P[8] em 0,6% e G4P[8] em 7,2% em amostras de São Paulo (Carmona et al., 2006). Em Ponta Grossa, Paraná, 86,9% das amostras positivas para RV-A provenientes de crianças menores de cinco anos de idade e adultos pertenciam ao genótipo G1P[8] (Pietruchinski et al., 2006).

Um estudo conduzido nos Estados Unidos por Clark e colaboradores (1987), um aumento na frequência do emergente genótipo G9 tem sido observado em várias partes do mundo, tornando-se o quinto genótipo mais comum mundialmente (Araújo et al., 2001; Kirkwood et al., 2003; Chen et al., 2005; Carmona et al., 2006, Volotão et al., 2006).

Relatos recentes de infecções por RV-A associadas aos genótipos menos usuais vêm sendo descritos em diferentes partes do Brasil. Em Salvador, foram detectados 78,8% de G9P[8] em amostras positivas para RV provenientes de crianças menores de cinco anos de idade (Santos et al., 2005). No Paraná, foram identificados os genótipos G9 P[8] em 33%, G12 P[6] em 1,6%, e, pela primeira vez no Brasil, foi relatado o genótipo G12P[9] em uma amostra proveniente de uma criança de 11 meses de idade com gastroenterite aguda (Pietruchinski et al., 2006).

No Rio de Janeiro, Volotão e colaboradores (2006) descreveram os genótipos G10P[9] em fezes de uma criança hospitalizada e G8P[4] em criança não hospitalizada.

Recentemente, na cidade de Salvador, durante os anos de 1999, 2000 e 2002, Serravalle e colaboradores (2007) descreveram o genótipo G9 P[8] entre crianças hospitalizadas com diarreia por RV-A. Nossos dados mostram o genótipo G9P[8] circulando na mesma área geográfica durante o ano de 2001. Estes resultados demonstram que os vírus circulantes na comunidade refletem, em geral, o que ocorre no âmbito hospitalar. Esses dados mostram que uma vigilância dos genótipos circulantes é necessária, principalmente para o monitoramento e entendimento de como a vacina monovalente contra RV-A, incluída no Programa Nacional de imunização, irá influenciar na epidemiologia dos diferentes genótipos P e G de RV-A circulantes.

Os HAstV são reconhecidos como importantes agentes da gastroenterite infantil. São patógenos endêmicos associados a surtos de gastroenterite em comunidades e em ambientes fechados como escolas, creches, instituições geriátricas, além de hospitais e unidades pediátricas (Mitchell, 2002). Estudos utilizando RT-PCR estabeleceram os HAstV como responsáveis por 85% de casos de diarreia em comunidades, destacando-se como de importância clínica em surtos e hospitalizações (Walter & Mitchell, 2003).

Alguns fatores impedem a avaliação correta da importância desses agentes nas infecções. A grande frequência de co-infecções com outros patógenos que estão implicados em casos de gastroenterite e a dificuldade de genotipagem das amostras de HAstV isoladas, tornam difícil evidenciar o papel deste patógeno nas infecções mistas, como observado em relatos que citam o HAstV co-infectando principalmente com RV-A (Mendéz-Toss et al., 2004; Carvalho-Costa et al., 2006; Victoria et al., 2007b, Sdiri-Loulizi et al., 2008).

Neste estudo, a genotipagem das sete amostras positivas para HAstV foi realizada utilizando o método de *nested* PCR (Multiplex-RT-PCR), com oligonucleotídeos genótipo-específicos conforme descrito por Sakamoto e

colaboradores (2000), com algumas modificações (Miranda, 2004). Esse método utiliza vários oligonucleotídeos específicos em apenas uma reação, o que reduz o tempo de execução e o gasto efetivo com reagentes, possibilitando a genotipagem dos diferentes HAstV em uma só reação (Sakamoto et al., 2000). Estudo realizado por Gabbay e colaboradores (2007b) demonstrou uma boa correlação entre a genotipagem do HAstV-8 pelo método descrito por Sakamoto e colaboradores (2000) e o seqüenciamento de nucleotídeos utilizando oligonucleotídeos específicos pra região do capsideo viral (Mon 269/270).

Estudos realizados em diferentes países têm descrito a predominância do HAstV-1 como o genótipo mais freqüente seguido dos HAstV-2, 3, 4, 5 e 8 (Noel et al., 1995; Sakamoto et al., 2000; Silva et al., 2001; Guix et al., 2002; Gabbay et al., 2006; Gabbay et al., 2007a; Gabbay et al., 2007c; Victoria et al., 2007b; Resque et al., 2007). Os HAstV-6 e 7 são os mais raramente detectados (Guix, et al., 2002; Mendez-Toss et al., 2004; Gabbay et al., 2007b).

Neste estudo não foi detectada a presença do HAstV-1. Este fato foi uma surpresa porque, como já referido, a predominância do HAstV-1 em relação aos outros genótipos é um dado descrito por diversos autores em diferentes estudos epidemiológicos, inclusive naqueles realizados no Brasil (Mitchell, 2002; Silva et al., 2001; Espul et al., 2004; Gabbay et al., 2007c; Victoria et al., 2007b; Soares et al., 2008).

De acordo com o método de *nested* PCR (Multiplex-RT-PCR), a análise das sete amostras positivas para HAstV revelou que três amostras eram HAstV-6, outras três HAstV-8 e uma amostra HAstV-7.

Os HAstV-6 e 7 não têm sido identificados de maneira freqüente. Em um estudo realizado com amostras de surtos de diarreia aguda em crianças do México foi descrita a co-circulação do HAstV-7 com outros cinco sorotipos, sendo o HAstV-2 o mais freqüente (Walter et al., 2001). No Brasil, a presença do HAstV-6 é descrita em um estudo retrospectivo, com amostras de crianças de Belém-PA, co-circulando com os genótipos 1, 2, 3, e 4 e 6 em 6,3% dos casos (Gabbay et al., 2007a).

Depois da primeira descrição do protótipo de HAstV-8 no Reino Unido em 1995, há vários estudos que relatam a ocorrência deste genótipo como os realizados em Gaza e Uganda (Monceyron et al., 1997), no Paquistão (Sakamoto et al., 2000), na Espanha (Guix, et al., 2002), na Hungria (Mendez-Toss et al., 2004) e, mais recentemente, no Brasil (Silva et al., 2006; Gabbay et al., 2007b, Victoria et al., 2007). A detecção do HAstV-8 em nosso estudo corrobora com os achados de outros autores que sugerem que o HAstV-8 é um tipo emergente em diversos países, inclusive no Brasil (Mendez-Toss et al., 2004; Gabbay et al., 2007b).

A co-circulação de diferentes genótipos, especialmente os tipos raros, deve ser considerada para futuras estratégias de prevenção e de controle da transmissão dos HAstV. Novos estudos, em diferentes regiões do Brasil, são necessários para entender melhor o real impacto da infecção por HAstV, principalmente em casos de gastroenterite aguda que ocorrem em comunidades.

Apesar das co-infecções envolvendo NoV, RV e HAstV serem freqüentemente citadas na literatura (Akihara et al., 2005; Bryce et al., 2005, Dennehy, 2005; Carvalho-Costa et al., 2006; Victoria et al., 2007a; Ferreira et al., 2008; Sdiri-Loulizi et al., 2008), neste estudo a co-infecção entre os diferentes vírus ou genótipos investigados não foi observada nas amostras fecais analisadas.

No Brasil, os índices de incidência de diarreia entre crianças variam entre diferentes regiões e localidades. Em Salvador, um estudo mostrou que houve uma diminuição na taxa da incidência das doenças diarreicas em 22% devido às ações de saneamento urbano implantado nas mesmas comunidades onde esta pesquisa foi realizada. Porém, a Região Nordeste ainda apresenta a mais alta taxa de mortalidade infantil do país, e nessa região, as gastroenterites são a segunda causa de morte em crianças menores de cinco anos de idade (Bezerra et al., 2007; Barreto et al., 2007).

O conhecimento da circulação dos diferentes vírus deve ser considerado nas ações e estratégias da prevenção e de controle da transmissão dessas viroses. Futuros estudos em comunidades, em diferentes regiões do Brasil, são necessários para o entendimento do curso natural da infecção, no conhecimento do real impacto

causado pelas infecções menos freqüentes auxiliando em novos estudos com eventuais vacinas, que hoje representam um grande desafio no combate a gastroenterite infantil.

7- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7.1 - CONCLUSÕES

- A detecção de NoV em 7,9% dos casos de gastroenterite aguda em crianças menores de 3 anos de idade, demonstrou a circulação deste vírus nas comunidades investigadas da cidade de Salvador, BA, durante o período estudado;
- O seqüenciamento de um fragmento da região B permitiu a caracterização molecular do NoV, confirmando a circulação do genótipo GII, nesta população;
- O uso do par de oligonucleotídeo 289/290, capaz de detectar NoV e SaV, possibilitou a detecção de duas amostras de SaV e permitiu a genotipagem de uma amostra como SaV humano GII;
- Pela técnica de Nested PCR (*multiplex* RT-PCR) as amostras positivas para HAstV foram genotipadas e caracterizadas como pertencentes aos genótipos considerados menos comuns (HAstV 6,7 e 8);
- A caracterização molecular do RV-A demonstrou a presença do genótipo mais comum G1P[8] e do emergente genótipo G9P[8];
- Nossos resultados apontam a grande diversidade dos mais importantes vírus responsáveis pela gastroenterite aguda acometendo crianças pertencentes a comunidades em áreas carentes na cidade de Salvador, Bahia.

7.2 - PERSPECTIVAS

Submeter as amostras de HAstV, identificadas neste estudo, à técnica de sequenciamento de nucleotídeos para comparação com outras amostras circulantes no Brasil e no mundo, uma vez que observamos os tipos considerados mais raros.

Dar continuidade ao trabalho de vigilância epidemiológica dos Astrovírus, trabalho que realizo deste 2005, no LVC-LRRGV.

Padronizar protocolo de RT-PCR em tempo real, para detecção dos HAstV em amostras fecais, visando o estabelecimento de outras técnicas de diagnóstico realizado pelo LVC-LRRGV.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Hansman G, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a daycare center in Japan. *Arch Virol* 2005; **150**: 2061-75.

Appleton H., Higgins PG. Letter: Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet*. 1975 **7**;1: (7919):1297.

Araújo IT, Ferreira MSR, Fialho AM, Assis RM, Cruz CM, Rocha M, Leite JP. Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 1999-2001.

Araújo IT, Fialho AM, Assis RM, Rocha M, Rocha M, Galvão M, Cruz CM, Ferreira MS, Leite JP. Rotavirus strain diversity in Rio de Janeiro, Brazil: characterization of VP4 and VP7 genotypes in hospitalized children. *J Trop Pediatr* 2002; **48**: 214-18.

Araújo IT, Heinemann MB, Mascarenhas JD, Araújo IT, Heinemann MB, Mascarenhas JD, Assis RM, Fialho AM, Leite JP. Molecular analysis of the NSP4 and VP6 genes of rotavirus strains recovered from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol* 2007; **56** 6: 854-59.

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of non-cultivable gastroenteritis viruses. The human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**: 15-37.

Barreto ML, Genser B, Strina A, Teixeira MG, Assis AM, Rego RF, Teles CA, Prado MS, Matos SM, Santos DN, dos Santos LA, Cairncross S. Effect of city-wide sanitation programme on reduction in rate of childhood diarrhoea in northeast Brazil: assessment by two cohort studies. *Lancet* 2007; **370**:1622-8.

Barreto ML, Milroy CA, Strina A, Prado MS, Leite JP, Ramos EA, Ribeiro H, Alcantara-Neves NM, Teixeira MDAG, Rodrigues LC, Ruf H, Guerreiro H, Trabulsi LR. Community-based monitoring of diarrhea in urban Brazilian children: incidence and associated pathogens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; **100**: 234-42.

Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Lüthi TM. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol.* 2002; **68**:1925-31.

Bezerra Filho JG, Pontes LR, Miná DD, Barreto ML. Infant [mortality and sociodemographic conditions in Ceará, Brazil, 1991 and 2000. *Rev Saúde Pública* 2007; **41**:1023-31.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973; **2**:1281-83.

Blanton LH, Adams SM, Beard RS, Wei G, Bulens SN, Widdowson MA, Glass RI, Monroe SS. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J Infect Dis* 2006 **1**;193:413-21.

Bon F, Ambert-Balay K, Giraudon H, Kaplon J, Le Guyader S, Pommepuy M, Gallay A, Vaillant V, de Valk H, Chikhi-Brachet R, Flahaut A, Pothier P, Kohli E. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of

gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4659-64.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der

Noorda AJ. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; **26**: 495-503.

Borges AM, Teixeira JM, Costa PS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco Rde C, Brito WM, Leite JP, Cardoso DD. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; **101**: 721-24.

Bryce J, Black RE, Walker N, Bhutta ZA, Lawn JE, Steketee RW. Can the world afford to save the lives of 6 million children each year? *Lancet*; 365:2193-2200. *Lancet* 2005; **1**: 365: 2153-4.

Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 327-33.

Cardoso DDP, Fiaccadori FS, Borges de Lima Dias e Souza M, Bringel Martins RM, Gagliardi Leite JP. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiânia, Goiás, Brazil. *Med Sci Monit* 2002; **8**: 624-8.

Carmona RC, Timenetsky Mdo C, Morillo SG, Richtzenhain LG. Human rotavirus serotype G9, Sao Paulo, Brazil, 1996-2003. *Emerg Infect Dis* 2006;12:963-8.

Carneiro NB, Diniz-Santos DR, Fagundes SQ, Neves LL, Reges RM, Lima EK, Quadros VH, Soares LE, Silva FS, Schneiter Hde G, Figueiredo I, Silva LR. Clinical

and epidemiological aspects of children hospitalized with severe rotavirus-associated gastroenteritis in Salvador, BA, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2005; **9**: 525-28.

Carvalho-Costa FA, Assis RM, Fialho AM, Boia MN, Alves DP, Martins CM, Leite JP. Detection and molecular characterization of group A rotavirus from hospitalized children in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; **101**: 291-94.

Castello AA, Arvay ML, Glass RI, Gentsch J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. *Pediatr Infect Dis J* 2004; **23**:168-72.

Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinje J, Racz ML. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo State Brazil *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 3947-53.

Chan MC, Sung JJ, Lam RK, Chan PK, Lai RW, Leung WK. Sapovirus detection by quantitative real-time RT-PCR in clinical stool specimens. *J Virol Methods* 2006; **134**:146-53

Charles MD, Holman RC, Curns AT, Parashar UD, Glass RI, Bresee JS. Hospitalizations associated with rotavirus gastroenteritis in the United States, 1993-2002. *Pediatr Infect Dis J* 2006 ;**25**:489-93.

Chen SY, Chang YC, Lee YS, Chao HC, Tsao KC, Lin TY, Ko TY, Tsai CN, Chiu CH. Molecular epidemiology and clinical manifestations of viral gastroenteritis in hospitalized pediatric patients in Northern Taiwan *J Clin Microbiol* 2007; **45**:2054-7.

Chen KT, Chen PY, Tang RB, Huang YF, Lee PI, Yang JY, Chen HY, Bresse J, Hummelman E, Glass R. Sentinel hospital surveillance for rotavirus diarrhea in Taiwan, 2001-2003. *J Infect Dis* 2005 **1**;192: S44-8.

Cheng AC, McDonald JR, Thielman NM. Infectious diarrhea in developed and developing countries *J Clin Gastroenterol* 2005; **39**:757-73.

Clark B, McKendrick M. A review of viral gastroenteritis *Curr Opin Infect Dis* 2004 **17**:461-9.

Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, Groff J, Hess G, Bachman P, Offit PA. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype *J Clin Microbiol* 1987 **25**:1757-62.

Cunliffe NA, Dove W, Gondwe JS, Thindwa BD, Greensill J, Holmes JL, Bresee JS, Monroe SS, Glass RI, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. Detection and characterization of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre Malawi *J Med Virol* 2002; **67**: 563-66.

Cunliffe NA, Gondwe JS, Graham SM, Thindwa BD, Dove W, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 836-43.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, Kumar R, Bhan MK, Glass RI. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India *J Clin Microbiol* 1994; **32**:1820-2.

Dennehy PH. Acute diarrheal disease in children: epidemiology, prevention, and treatment. *Infect Dis Clin North Am* 2005; **19**: 585-602.

D'Souza RM, Hall G, Becker NG. Climatic factors associated with hospitalizations for rotavirus diarrhoea in children under 5 years of age. *Epidemiol Infect* 2007; **12**:1-9.

Estes MK Rotavirus and their replication In: Knipe DM, Rowley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizaman B. Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Williams &Wilkins, 2001. p. 1747-85.

Espul C, Martínez N, Noel JS, Cuello H, Abrile C, Grucci S, Glass R, Berke T, Matson DO Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis J Med Virol 2004; **72**:75-82.

Ferreira MSR, Xavier MP, Fumian TM, Victoria M, Oliveira SA, Pena LH, Leite JP, Miagostovich MP. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro J Med Virol 2008; **80**:338-44.

Filho EP, da Costa Faria NR, Fialho AM, de Assis RS, Almeida MM, Rocha M, Galvão M, dos Santos FB, Barreto ML, Leite JP. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. J Med Microbiol. 2007; **56**:313-9.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H Virus particles in gastroenteritis Lancet 1973; **2**:1497.

Gabbay YB, Glass RI, Monroe SS. Prevalence of antibodies to Norwalk virus among Amerindians in isolated Amazonian communities. Am J Epidemiol 1994; 139: 728-733.

Gabbay YB, Linhares AC, Cavalcante-Pepino EL, Nakamura LS, Oliveira DS, da Silva LD, Mascarenhas JD, Oliveira CS, Monteiro TA, Leite JP. Prevalence of human astrovirus genotypes associated with acute gastroenteritis among children in Belém, Brazil. J Med Virol 2007a; **79**:530-8.

Gabbay YB, Linhares AC, Oliveira DS, Nakamura LS, Mascarenhas JD, Gusmão RH, Heinemann MB, Macêdo O, Leite JP. First detection of a human astrovirus type 8

in a child with diarrhea in Belém, Brazil: comparison with other strains worldwide and identification of possible three lineages. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007b; **102**:531-4.

Gabbay YB, Leite JP, Oliveira DS, Nakamura LS, Nunes MR, Mascarenhas JD, Heinemann MB, Linhares AC. Molecular epidemiology of astrovirus type 1 in Belém, Brazil, as an agent of infantile gastroenteritis, over a period of 18 years (1982-2000): identification of two possible new lineages. Virus Res 2007c; **129**:166-74.

Gabbay YB, Chamone CB, Nakamura LS, Oliveira DS, Abreu SF, Cavalcante-Pepino EL, Mascarenhas JD, Leite JP, Linhares AC. Characterization of an astrovirus genotype 2 strain causing an extensive outbreak of gastroenteritis among Maxakali Indians, Southeast Brazil. J Clin Virol 2006; **37**: 287-92.

Gabbay YB, Morais MAA, Alves AS, Oliveira KK, Mascarenhas JDP, Linhares AC, Gallimore CI, Barreiros MA, Brown DW, Nascimento JP, Leite JP. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Med Biol Res 2004; **37**: 321-26.

Gallimore CI, Barreiros MA, Brown DW, Nascimento JP, Leite JP. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Med Biol Res. 2004; **37**:321-6

Geigenmuller U, Ginzton NH, Matsui SM Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells J Gen Virol 2002; **83**:1691-95.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction assay J Clin Microbiol 1992; **30**: 1365-73.

Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis* 2005; **192**:146-59.

Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparc-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 2000; **74**: 6581-91.

Glass RI, Bresse J, Jiang B. Gastroenteritis viruses: an overview. **In:** Chardwick D, Goode JA (eds) *Gastroenteritis Viruses* (Novartis Foundation Symposium 238) Wiley, Chichester, 2001; 5-25.

Goodgame R. Norovirus gastroenteritis *Curr Infect Dis Rep* 2007; **9**:102-09.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke In, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MI, Thiel HJ Taxonomy of the caliciviruses *J Infect Dis* 2000; **181**: 322-30.

Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. Human Caliciviruses. **In:** Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. (eds.) *Fields in Virology* Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 4th ed. 2001 vol 1, p. 875-93.

Green KY. *Caliciviridae*: The Noroviruses. **In:** Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. (eds.) *Fields in Virology* Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 5th ed. 2006 vol 1, p. 949-78.

Guix S, Bosch A, Pinto RM. Human astrovirus diagnosis and typing: current and future prospects. *Lett Appl Microbiol* 2005; **41**: 103-05.

Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolome R, Latorre C, Rabella N, Simó M, Bosch A, Pintó RM. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 133-39.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999; **41**: 95-98

Hansman GS, Tomoichiro O, Kazuhiko K, Naokazu T. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol* 2007; **17**: 133-41.

Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* 2005 **1**; 253:1-8.

Herrmann JE, Nowak NA, Perron-Henry DM, Hudson RW, Cubitt WD, Blacklow NR. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1990; **161**: 226-29.

Iturriza-Gómara M, Isherwood B, Desselberger U, Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J Virol* 2001; **75**: 3696-3705.

Iturriza-Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol* 2002; **76**: 6596-6601.

Jiang B, Monroe SS, Koonin EV, Stine SE, Glass RI. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**:10539-43.

Jiang X, Espul C, Zhong WM, Cuello H, Matson DO Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant Arch Virol 1999; **144**:2377-87.

Kang G, Iturriza-Gomara M, Wheeler JG, Crystal P, Monica B, Ramani S, Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase vaccine. Rev Med Virol 2005; **15**:29-56.

Kapikian AZ, Yasutaka H, Chanock RM. Rotavirus. In: Knipe DM, Rowley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizaman B (eds). Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Williams &Wilkins, 2001 p. 1787-1833.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica ARL, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis J Virol 1972; **10**: 1075-81.

Kilgore PE, Glass RI Gastrointestinal syndromes In: Clinical Virology, Edited by Richman, DD, Whitley, RJ, Hayden FG, Churchill Livingstone New York, 1997; 1 ed. p 55-67.

Kirkwood C, Bogdanovic-Sakran N, Palombo E, Masendycz P, Bugg H, Barnes G, Bishop R. Genetic and antigenic characterization of rotavirus serotype G9 strains isolated in Australia between 1997 and 2001. J Clin Microbiol 2003; **41**:3649-54.

Kobayashi N, Taniguchi K, Kojima K, Urasawa T, Urasawa S. (VP7) serotype-dependent preferential VP7 gene selection detected in the genetic background of simian rotavirus SA11. Arch Virol 1996; **141**: 1167-76.

Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. J Virol Methods 2002; **100**: 107-114.

Koopmans MP. Outbreaks of viral gastroenteritis, in particular due to the Norwalk virus: an underestimated problem. *Ned Tijdschr Geneesk* 2002; **146**: 2401-04.

Kroneman A, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y, Gray J, Iturriza M, Böttiger B, et al. Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses. *J Public Health (Oxf)* 2008; **30**:82-90.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 2001; **17**: 1244-45.

Leite JP, Alfieri AA, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch Virol* 1996; **141**: 2365-74.

Leite JPG, Barth OM, Scharzmayr HG. Astrovirus in Faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias de Oswaldo Cruz* 1991 **86**: 489-90.

Lew JF, Moe CL, Monroe SS, Allen JR, Harrison BM, Forrester BD, Stine SE, Woods PA, Hierholzer JC, Herrmann JE. Astrovirus and adenovirus associated with diarrhea in children in day care settings. *J Infect Dis* 1991; **164**: 673-78.

Linhares AC, Gabbay YB, Freitas RB, Da Rosa ES, Mascarenhas JD, Loureiro EC. Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belem, Brazil. *Epidemiol Infect* 1989; **102**:129-45.

Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, De Freitas RB, Oliveira CS, Bellesi N, Monteiro TF, Lins-Lainson Z, Ramos FL, Valente SA. Prospective study of rotavirus infections in Belem, Para, Brazil: clinical and epidemiological features. *J Pediatr* 1994; **70**: 220-25.

Liu C, Grillner L, Jonsson K, Linde A, Shen K, Lindell AT, Wirgart BZ, Johansen K. Identification of viral agents associated with diarrhea in young children during a winter season in Beijing, China. *J Clin Virol* 2006; **35**: 69-72.

Lopez L, Castillo FJ, Fernandez MA, Clavel A, Rubio MC, Gomez-Lus R, Cutillas B. Astrovirus infection among children with gastroenteritis in the city of Zaragoza, Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; **19**: 545-47.

Lopman BA, Reacher MH, Vipond IH, Sarangi J, Brown DW. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 318-24.

Madeley CR, Cosgrove BP. 28nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 1975; **1**: 451-52.

Maldonado Y, Cantwell M, Old M, Hill D, Sanchez MI, Logan L, Millan-Velasco F, Valdespino JI, Sepulveda J, Matsui S. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *J Infect Dis* 1998; **178**: 334-39.

Marie-Cardine A, Goullain K, Mouterde O, Castignolles N, Hellot Mf, Mallet E, Buffet-Janvresse C. Epidemiology of acute viral gastroenteritis in children hospitalized in Rouen, France. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 1170-78.

Marocco A, Assael B, Gabutti G, Guarino A, Lopalco PI, Marchetti F, Ruggeri FM, Titone L, Tozzi AE, Vitali Rosati G, Zotti C, Franco E. Hospitalisation associated with Rotavirus gastroenteritis in Italy, 2001-2003, evaluated by means of ICD9-CM diagnostic codes. *Ig Sanita Pubbl* 2006; **62**: 215-44.

Martella V, Bányai K, Ciarlet M, Iturriza-Gómara M, Lorusso E, De Grazia S, Arista S, et al. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: Evidence that the

different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology* 2006; **344**: 509-19.

Mascarenhas JD, Leite JP, Gabbay YB, Freitas RB, Oliveira CS, Monteiro TA, Linhares AC. Rotavirus G serotypes and p[8],G genotypes identified in cases of reinfection among children participating in a trial with rhesus-human reassortant tetravalent vaccine (RRV-TV) in Belem, Brazil. *J Trop Pediatr* 2002; **48**: 93-97.

Matsuno S, Hasegawa A, Kalica AR, Kono R. Isolation of a recombinant between simian and bovine rotaviruses. *J Gen Virol* 1980; **48**: 253-56.

Matsui SM, Greenberg HB. Astroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Chanock R M, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. (eds.) *Fields in Virology* Philadelphia Lippincott-Raven Publishers, 2001; 4th ed vol 1, p. 875-93.

Maunula L, Kalso S, Von Bonsdorff CH, Ponka A. Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. *Epidemiol Infect* 2004; **132**: 737-43.

Meakins SM, Adak GK, Lopman BA, O'brien SJ General outbreaks of infectious intestinal disease (IID) in hospitals, England and Wales, 1992-2000. *J Hosp Infect* 2003; **53**:1-5.

Méndez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, Guiscafré H, Cedillo R, Muñoz O, Herrera I, López S, Arias CF. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 151-7.

Miranda VQS. Detecção e caracterização molecular de astrovírus em crianças menores de dois anos com gastroenterite aguda no município do Rio de Janeiro, RJ. Rio de Janeiro; 2004. Mestrado [Pós-Graduação em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz.

Mitchell DK. Astrovirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 2002; **21**: 1067-69.

Monceyron C, Grinde B, Jonassen TO. Molecular characterization of the 3'-end of the astrovirus genome. *Arch Virol* 1997; **142**:699-706.

Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000; **181**: 284-87.

Naficy AB, Rao MR, Holmes JL, Abu-Elyazeed R, Savarino SJ, Wierzba TF, Frenck RW, Monroe SS, Glass RI, Clemens JD. Astrovirus diarrhea in Egyptian children *J Infect Dis* 2000; **1982**: 685-90.

Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 797-801.

Oh D, Schreier E. Molecular characterization of human astroviruses in Germany. *Arch Virol* 2001; **146**: 443-455.

Okada M, Ogawa T, Kaiho I, Shinozaki K. Genetic analysis of noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4391- 401.

Okitsu-Negishi S, Nguyen TA, Phan TG, Ushijima H. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. *Pediatr Int* 2004; **46**: 245-52.

Parashar UD, Bresee JS, Glass RI. The global burden of diarrhea disease in children. *Bull World Health Organ* 2003; **81**: 236.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**:304-06.

Parks CG, Moe CL, Rhodes D, Lima A, Barrett L, Tseng F, Baric R, Talal A, Guerrant R. Genomic diversity of "Norwalk like viruses" (NLVs): pediatric infections in a Brazilian shantytown. *J Med Virol* 1999; **58**: 426-34.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Andrade ZP, De Castro L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J Virol Methods* 1985; **10**: 21-8.

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

Pietruchinski E, Benati F, Lauretti F, Kisielius J, Ueda M, Volotão EM, Soares CC, et al. Rotavirus diarrhea in children and adults in a southern city of Brazil in 2003: distribution of G/P types and finding of a rare G12 strain. *J Med Virol* 2006; **78**:1241-49.

Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 1999; **286**: 287-90.

Prasad BV, Wang GJ, Clerx JP, Chiu W. Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol* 1988; **199**:269-75.

Rahman M, Matthijnssens J, Goegebuer T, De Leener K, Vanderwegen L, Van Der Donck I, Van Hoovels L, et al. Predominance of rotavirus G9 genotype in children hospitalized for rotavirus gastroenteritis in Belgium during 1999-2003. *J Clin Virol* 2005; **33**:1-6.

Resque HR, Munford V, Castilho JG, Schmich H, Caruzo TA, Rácz ML. Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007 **102**:969-74.

Richards GP, Watson MA, Fankhauser RL, Monroe SS. Genogroup I and II noroviruses detected in stool samples by real-time reverse transcription-PCR using highly degenerate universal primers. *Appl Environ Microbiol* 2004; **70**: 7179-84.

Rodriguez-Guillen L, Vizzi E, Alcalá AC, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *J. Clin. Virol* 2005; **33**:104-9.

Royuela E, Negredo A, Sanchez-Fauquier A. Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. *J Virol Methods* 2006; **133**: 9-14.

Sakamoto T, Negishi H, Wang QH, Akihara S, Kim B, Nishimura S, Kaneshi K, et al. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). *J Med Virol* 2000; **61**:326-31.

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

Santos N, Volotão EM, Soares CC, Campos GS, Sardi SI, Hoshino Y. Predominance of rotavirus genotype G9 during the 1999, 2000, and 2002 seasons among hospitalized children in the city of Salvador, Bahia, Brazil: implications for future vaccine strategies. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4064-69.

Sdiri-Loulizi K, Gharbi-Khélifi H, de Rougemont A, Chouchane S, Sakly N, Ambert-Balay K, Hassine M, et al. Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *J Clin Microbiol.* 2008; **20**:46 (4) 1349-55.

Serravalle K, Santos N, Sardi SI, Silva SP, Ribeiro Junior Hda C, Mattos AP, Campos GS. Molecular characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Salvador, Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2007; **1**:35-9.

Silva AM, Leite EG, Assis RM, Majerowicz S, Leite JP. An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 in a daycare center, in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 2001; **96**: 1069-73.

Silva PA, Cardoso DD, Schreier E. Molecular characterization of human astroviruses isolated in Brazil, including the complete sequences of astrovirus genotypes 4 and 5. *Arch Virol* 2006 **151**:1405-17.

Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MC, Maranhão AG, Rocha LN, Ramírez ML, Monroe SS, Glass RI, Gentsch J. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007 **13**:1244-6.

Soares CC, Maciel de Albuquerque MC, Maranhão AG, Rocha LN, Ramírez ML, Benati FJ, Timenetsky M do C, Santos N. Astrovirus detection in sporadic cases of diarrhea among hospitalized and non-hospitalized children in Rio De Janeiro, Brazil, from 1998 to 2004. *J Med Virol* 2008; **80**:113-7.

Straub TM, Höner ZU, Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer Bk, Bartholomew RA, et al. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis* 2007; **13**: 396-403.

Strina A, Cairncross S, Barreto ML, Larrea C, Prado MS. Childhood diarrhea and observed hygiene behavior in Salvador, Brazil. *Am J Epidemiol* 2003 **157**:1032-8.

Tan M, Hegde RS, Jiang X. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol* 2004; **78**: 6233-42.

Thornton AC, Jennings-Conklin KS, McCormick MI. Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Manag Response* 2004; **2**: 4-9.

Timenetsky MCS, Kisielius JJ, Grisi SJ, Escobar AMU, Ueda M, Tanaka H. Rotavírus, Adenovírus, Astrovírus, Calicivírus e “Small Round Virus particles” em fezes de crianças, com e sem diarreia aguda, no período de 1987 a 1988, na grande São Paulo. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1993; **35**: 275-80.

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

Turcios RM, Widdowson MA, Sulka AC, Mead PS, Glass RI. Reevaluation of epidemiological criteria for identifying outbreaks of acute gastroenteritis due to norovirus: United States, 1998-2000. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 970-71.

Uhnou I, Olding-Stenkvis E, Kreuger A. Clinical features of acute gastroenteritis associated with rotavirus enteric adenovirus and bacteria. *Arch Dis Child* 1986 **61**:732-38.

Vernacchio L, Vezina RM, Mitchell AA, Lesko SM, Plaut AG, Acheson DW Diarrhea in American infants and young children in the community setting: incidence, clinical presentation and microbiology. *Pediatr Infect Dis J.* 2006; **25**:2-7.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JPG, Miagostovich MP Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *J Pediatr Infect Dis* 2007a; **26**: 1-5.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich MP Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 2007b; **79**: 939-44.

Volotão EM, Soares CC, Maranhão AG, Rocha LN, Hoshino Y, Santos N. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J Med Virol* 2006; **78**:263-72.

Walter JE, Mitchell DK. Astrovirus infection in children. *Curr Opin Infect Dis* 2003; **16**:247-53.

Walter JE, Mitchell DK, Guerrero ML. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurbano community of Mexico City. *J Infect. Dis.* 2001; **183**: 681-86.

Wang QH, Han MG, Funk JA, Bowman G, Janies DA, Saif LJ Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. *J Clin Microbiol* 2005 **43**:5963-72.

Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis *Clin Microbiol Infect* 2003; **9**: 247-62.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006; **346**: 312-323.

9 – ANEXOS

Anexo 1 – Artigo científico

Anexo 2 – E-mail da submissão do artigo científico

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](#)