

Yvone Gabbay-Mendes

**Detecção e genotipagem de astrovírus de
casos de gastroenterites ocorridos em Belém
(PA), São Luís (MA) e surto em reserva
indígena de Minas Gerais**

DBP/IOC

FIOCRUZ

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Yvone Gabbay-Mendes

Detecção e genotipagem de astrovírus de casos de gastroenterites ocorridos em Belém (PA), São Luís (MA) e surto em reserva indígena de Minas Gerais

Tese de doutorado apresentada a Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz para obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de Genética e Bioquímica.

Orientadores: Dr. José Paulo Gagliardi Leite
Dr. Alexandre da Costa Linhares

Rio de Janeiro

2007

Gabbay-Mendes, Yvone

Detecção e genotipagem de astrovírus de casos de gastroenterites ocorridos em Belém (PA), São Luís (MA) e surto em reserva indígena de Minas Gerais / Yvone Gabbay-Mendes. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2007.

122 f. il.

Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

1. Astrovírus humano – epidemiologia 2. Biologia molecular I. Fundação Oswaldo Cruz. II. Instituto Oswaldo Cruz. Departamento de Virologia. III. Título.

CDU: 616.34-002:578

Detecção e genotipagem de astrovírus de casos de gastroenterites ocorridos em Belém (PA), São Luís (MA) e surto em reserva indígena de Minas Gerais

Yvone Gabbay Mendes

Tese submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de doutor.

Aprovado: 24 de outubro de 2007

Banca Examinadora:

Membros titulares:

Presidente




Dra. Flávia Barreto dos Santos
Laboratório de Flavivirus, IOC/Fundação Oswaldo Cruz

Membros




Dra. Divina das Dores de Paula Cardoso
Pró-reitora de Pesquisa da Universidade Federal do Goiás
UFG



Dr. Marcelo Alves Pinto
Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico,
IOC/Fundação Oswaldo Cruz

Suplentes



Dra. Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia
Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense



Dra. Clara Fumiko Tachibana Yoshida
Laboratório Hepatites Virais, IOC/Fundação Oswaldo Cruz

“A felicidade não esta em fazer o que a gente quer e sim em querer o que a gente faz” (Jean Paul Sartre)

Dedicatória

A meus pais David (*in memoriam*) e Ruth, que sempre estiveram presentes em minha vida, pelo amor, carinho, dedicação e apoio incondicional, por tudo que representam na minha formação moral e profissional.

Ao Isaac, meu grande companheiro, por estar sempre ao meu lado, compartilhando de todos os momentos vividos durante esse estudo, me apoiando, incentivando, dando a força necessária para conseguir vencer mais esse desafio.

A Ruth e Salomão, filhos queridos, motivo de meu viver, pelo apoio, amor, carinho, compreensão demonstrados ao longo desta caminhada, e por aceitarem minha ausência nos diversos momentos deste trabalho.

Ao Saulo, filho do coração, pelo apoio e incentivo dado durante a realização deste estudo.

Agradecimentos

Ao Criador, Ser supremo, sempre presente em minha vida, pela coragem e força, e por ter me iluminado para chegar até este momento.

Aos meus orientadores Drs. José Paulo Gagliardi Leite, Chefe do Laboratório de Virologia Comparada da FIOCRUZ e Alexandre da Costa Linhares, Chefe da Seção de Virologia do IEC, cuja sabedoria, valiosa orientação, amizade demonstrada, estímulo, paciência, e busca da perfeição, tornaram possível a realização deste trabalho.

À direção do Instituto Evandro Chagas, na pessoa de sua Diretora Dra. Elisabeth Conceição de Oliveira Santos e a equipe técnico-administrativa, pelo apoio e suporte proporcionado no decorrer deste estudo.

Às Dras. Maria de Lourdes Contente Gomes, Darleise Silva Oliveira e Olinda Macêdo e ao Dr. Márcio Nunes, o meu muito obrigada, pela ajuda técnica, valiosas contribuições e sugestões, apoio e amizade.

À Dra. Amélia P. A. Travassos da Rosa, que mesmo a distância nos auxiliou e apoiou.

Às Dras. Rosa Helena P. Gusmão e Cláudia Regina N. E. da Luz, por nos ceder seus materiais e pelo apoio recebido.

Aos colegas do Laboratório de Astrovírus, Antônia Alves, Maria Silvia de Lucena, Krynssya Kleinlein Oliveira, Maria da Graça Miranda Ferreira, Ian Lima pelo apoio técnico, bem como aos ex-bolsistas do PIBIC/CNPq/IEC e CIEE, Lilianny S. Nakamura, Elielma L. Cavalcante-Pepino, Ivete V. Costa, Luciana D. da Silva, Hugo Resque, Gerlane G. da Silva por toda a dedicação, apoio e compreensão demonstrados durante a realização deste estudo.

Aos técnicos de pesquisa Sr. Antônio de Moura e Sr. Antônio Martins, responsáveis pela coleta do material fecal durante a realização de alguns desses estudos.

Aos colegas da Virologia Drs. Wyller Alencar de Mello, Joana D'Arc Pereira Mascarenhas, Ronaldo Barros de Freitas, Talita Monteiro, Consuelo Silva de

Oliveira, Rita Medeiros, Ceyla Castro, Ana Lúcia Wanzeller, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos pelo apoio e força recebidos.

À Dra. Flávia Barreto dos Santos meus agradecimentos pelo excelente trabalho de revisão, bem como pelas sugestões feitas a este trabalho.

A todos os funcionários e estagiários da Seção de Virologia do IEC, pelo apoio e carinho demonstrado, bem como aos demais colegas de outras Seções desta Instituição.

À bibliotecária do IEC Vânia B. da Cunha Araújo, meu muito obrigado, pela amizade e grande contribuição quando da revisão e editoração deste trabalho, bem como a Maria José A. Mateus, Isabella M. A. Mateus, Sheila de M. Lobo, Maria Izaeth B. do Carmo e Nilton M. Pereira pelo apoio técnico no levantamento e obtenção dos artigos, como também na editoração desta monografia.

A toda a equipe de informática do IEC, meu muito obrigado por todo o apoio recebido no decorrer deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Virologia Comparada da FIOCRUZ, pelo suporte e amizade.

Aos colegas da turma do Doutorado Aldo Valente, Elizabeth Salbé Travassos da Rosa, Ana Yecê, Eliete Araújo, Ana Maria Ventura, Vânia Noronha, Ester Miranda, Sâmia Demachki, Solange Costa, Gionovaldo Lourenço e Wallace Santos, pelo companheirismo, força e amizade, conquistados ao longo desta caminhada.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Dra. Ana Gaspar, à secretária Luciane Wandermurem e demais funcionários, por todos os serviços e orientação prestados no decorrer deste trabalho.

Aos professores da FIOCRUZ Cláudio Tadeu Daniel Ribeiro, Ricardo Lourenço, Márcio Bóia, José Rodrigues Coura, Henrique Lenz, Ana Maria Gaspar, Márcia Lazera, Bodo Wanke e Leonardo Carvalho pelos ensinamentos e incentivos recebidos ao longo deste trabalho.

Aos professores da UFPA Cristovam Picanço Diniz, Maria da Conceição Pinheiro, Luís Carlos Silveira e José Luís Nascimento pelo empenho na efetivação dessa pós-graduação.

À Secretaria Executiva de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente do Estado do Pará – SECTAM pela concessão de bolsa de estudo.

A todos os pais e crianças que participaram desses estudos.

À Bia, por todo apoio, amizade, dedicação e carinho dispensados ao longo desses anos, meu muito obrigado.

A toda a minha família e amigos pelo apoio, carinho e compreensão.

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta participaram da minha formação profissional e permitiram que este estudo fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

Os astrovírus humanos (HAstVs), família *Astroviridae*, são considerados importantes agentes etiológicos de gastroenterite aguda em crianças menores de cinco anos, estando associados a episódios endêmicos e a surtos em creches, asilos e comunidades, tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. O objetivo principal deste estudo foi a detecção e caracterização molecular dos HAstVs em amostras diarréicas provenientes de crianças que participaram de diversas pesquisas conduzidas em Belém, PA ao longo de 18 anos (1982-2000) e apresenta ainda os dados obtidos em crianças de São Luís, MA (1997-1999) e durante um surto de gastroenterite ocorrido na reserva indígena Maxakali, MG, em 2004. Os espécimes fecais foram inicialmente testados quanto à presença dos HAstV utilizando-se a técnica imunoenzimática (EIA). A nested-PCR e o seqüenciamento de nucleotídeos foram utilizados para a genotipagem e análise filogenética das amostras positivas. A confirmação foi observada em 6,1% (155/2.534) dos casos estudados em Belém-PA e São Luís-MA, analisando-se casos de diferentes populações: comunidade (2,7% e 5,4%), unidade de saúde (5,5%), creches (5,7%) e hospitais (6,3% a 9,9%). O HAstV-1 foi o genótipo mais prevalente durante os estudos realizados em Belém, PA e São Luís, MA (60,7%), com exceção de uma investigação ocorrida na comunidade onde o HAstV-2 predominou (58,3%). Das 85 amostras positivas para HAstV-1, 81 foram analisadas por seqüenciamento, sendo que 76 (93,8%) se classificaram na linhagem HAstV-1a e as demais como prováveis novas linhagens HAstV-1e (n=3) e HAstV-1f (n=2). Em pesquisa realizada na comunidade de Belém, PA, onde crianças foram monitoradas por dois anos consecutivos (1990 a 1992), dos 624 espécimes fecais testados 34 foram positivos (5,4%). Este percentual foi menor aos 8% detectado em São Luís, MA, em âmbito hospitalar, sendo 11% no grupo diarréico e 5% no não diarréico. O HAstV-1 foi o predominante em ambos os estudos (PA e MA), porém outros genótipos circularam concomitantemente. Nas duas pesquisas, a faixa etária mais acometida foi a de 0-6 meses: 9% e 18%, respectivamente. O HAstV-2 foi o responsável pelo primeiro surto ocorrido no Brasil em população indígena (Reserva Maxakali, MG), sendo também descrita pela primeira vez a linhagem HAstV-2c. Os dados obtidos nesses estudos demonstraram a importância dos HAstVs como causa de gastroenterite viral, e reforçam a necessidade de se continuar o monitoramento destas infecções no Brasil.

Abstract

The human astrovirus (HAstVs), *Astroviridae* family, are considered as important ethiological agents of acute gastroenteritis in children five years and under, being associated with endemic diarrhea and outbreaks in day-care centers, elderly people and communities in both developed and developing countries. The main objective of this study was the detection and molecular characterization of HAstVs in diarrheic samples from children that participated during several researches performed in Belém, PA, during 18 years (1982-2000), in São Luís, MA (1997-1999), and the detection of this virus during an outbreak of gastroenteritis among Indians of the Maxakali Reserve, MG, in the year of 2004. Nested-PCR and nucleotide sequencing were performed to characterize the HAstVs genotypes and for phylogenetic analysis. The overall positivity was of 6.1% (155/2,534), of the studied cases from Belém-PA and São Luís-MA, analysing cases from different populations: community (2.7% and 5.4%), health unit (5.5%), day-care centers (5.7%) and hospitals (6.3% to 9.9%). The HAstV-1 was the most prevalent genotype detected during the studies in Belém, PA, and São Luís, MA (60.7%), with exception of one investigation in the community where the HAstV-2 was predominant (58.3%). Of the 85 HAstV-1 positive samples, 81 were analyzed by sequencing, 76 (93.8%) of which belonging to lineage HAstV-1a, and the other as probable new lineages: HAstV-1e (n=3) and HAstV-1f (n=2). In a study conducted in the community of Belém, PA, among children followed-up for two consecutive years (1990 to 1992), of 624 fecal specimens tested 34 were positive (5.4%). This rate was smaller than that of 8% detected in São Luís, MA in a hospital, being 11% in the diarrheic group and 5% in the non-diarrheic group. The HAstV-1 was the predominant in both studies (PA and MA), although other genotypes had circulated concomitantly. In both studies the most affected age group was the 0-6 months: 9% and 18% respectively. The HAstV-2 was responsible for the first outbreak in Brazil, in an Indian population (Maxakali Reserve, MG), where the lineage HAstV-2c was described for the first time. The data obtained in these studies demonstrated the role of HAstVs in causing viral gastroenteritis, and reinforce the need for surveillance of those infections in Brazil.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Centígrados
aa	Aminoácido
ANV	Astrovírus de nefrite de aves
AstVs	Astrovírus
CaCo-2	Carcinoma de cólon humano
CAstV	Astrovírus de galinha
CsCl	Cloreto de céσιο
CV	Calicivirus
EIA	Ensaio imunoenzimático
FAstV	Astrovírus de felino
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HAstV-2	Hastv do tipo 2
HAstVs	Astrovírus humanos
HEK	Rim de embrião humano
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
hpi	Horas pós-inoculação
IEC	Instituto Evandro Chagas
IF	Imunofluorescência
IME	Imunomicroscopia eletrônica
kDa	Quilodaltons

LLCMK2	Linhagem contínua de células epiteliais de rim de macaco rhesus
ME	Microscopia eletrônica
MP	Máxima parcimônia
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
NJ	Agrupamento de vizinhos (<i>neighbor-joining</i>)
nm	Nanômetros
nt	Nucleotídeos
NV	Vírus norwalk / norovírus
OAstV	Astrovírus de ovino
ORF	Fase aberta de leitura (<i>open reading frame</i>)
PAstV	Astrovírus de suíno
pb	Pares de bases
PBK	Células primarias renais de símio Baboon
Pol	RNA polimerase-RNA dependente
Pro	Serino-protease
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico
RRV-TV	Vacina tetravalente para rotavírus, de origem símio-humana, geneticamente reestruturada.
RT-PCR	Reação em cadeia pela polimerase, precedida de transcrição reversa
RV	Rotavírus

SRSV	Pequenos vírus de estrutura arredondada (<i>small round structural virus</i>).
ssRNA	Fita simples de ácido ribonucleico
SV	Sapovirus
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TAstVs	Astrovírus de peru
TGF- β	Fator β de transformação e crescimento
VP	Proteína viral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Astrovírus humano	3
Figura 2 -	Diagrama esquemático da organização do genoma e regiões relacionadas à replicação do astrovírus humano tipo 1 (HAstV-1)	4
Figura 3 -	Esquema dos domínios funcionais da proteína do capsídeo do AstVs	6
Figura 4 -	Relação filogenética entre as espécies e sorotipos da família Astroviridae	8
Figura 5 -	Classificação dos astrovírus humanos em genogrupos pela análise filogenética, com base na fase aberta de leitura 1a (ORF1a)	10
Figura 6 -	Classificação dos astrovírus humanos, baseada na análise filogenética da fase aberta de leitura 1b	11
Figura 7 -	Classificação dos astrovírus humanos, baseada na análise filogenética da fase aberta de leitura 1b	11
Figura 8 -	Classificação dos genotipos e linhagens de astrovírus humanos, baseada na análise filogenética da fase aberta de leitura 2	12

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1	Histórico	1
1.2	A partícula viral e características físico-químicas	2
1.3	Classificação	7
1.4	Evolução	8
1.5	Genotipos de HAstVs	9
1.6	Patogênese e patologia	13
1.6.1	Transmissão	13
1.6.2	Replicação viral	13
1.6.3	Patogenia viral	14
1.7	Manifestações clínicas	15
1.7.1	Imunidade	17
1.8	Diagnóstico laboratorial	18
1.9	Epidemiologia	20
1.10	Tratamento	22
1.11	Controle e prevenção	23
2	Relevância	25
3	Objetivos	27
3.1	Geral	27
3.2	Específicos	27
4	Discussão	28
5	Conclusões e perspectivas	42
5.1	Conclusões	42
5.2	Perspectivas	43
	Referências	44
	APÊNDICES	66

APÊNDICE A	67
APÊNDICE B	77
APÊNDICE C	84
APÊNDICE D	94
APÊNDICE E	99
ANEXO	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

A gastroenterite aguda é uma das principais causas de morbi-mortalidade em crianças menores de cinco anos em escala mundial, causando mais de 700 milhões de casos, com três a cinco milhões de mortes ao ano, principalmente nos países em desenvolvimento (LINHARES & BRESEE, 2000; WILHELMI et al., 2003). Diferentes etiologias estão relacionadas às gastroenterites, entre as quais as bacterianas, parasitárias e virais.

A suspeita da participação dos vírus como agente etiológico em casos de gastroenterite humana foi confirmada em 1972, quando Kapikian et al. (1972) detectaram pela primeira vez, pequenas partículas virais em fezes provenientes de um surto diarréico ocorrido numa escola na cidade de Norwalk, Ohio, EUA, utilizando a técnica de imunomicroscopia eletrônica (IME). Esses foram, portanto, denominados de vírus Norwalk (NV). A partir desse achado, outros vírus que causam gastroenterite aguda foram descobertos, incluindo-se os rotavírus (1973), astrovírus e adenovírus entéricos (1975) (BISHOP et al., 1973; FLEWETT et al., 1973, 1975; MADELEY & COSGROVE, 1975). A importância dos rotavírus (RV) como principal causa de diarreia viral já está bem definida, sendo o mesmo responsável por 111 milhões de casos de gastroenterite infantil e cerca de 600 mil mortes por ano, principalmente nos países em desenvolvimento (LINHARES & BRESEE, 2000; PARASHAR et al., 2006).

O principal interesse no campo de saúde pública em relação aos astrovírus (AstVs) refere-se à implicação desses vírus em casos de diarreia esporádica, extensos surtos de gastroenterite, hospitalizações e mortes (WALTER & MITCHELL, 2003).

Os AstVs foram inicialmente caracterizados como vírus causadores de gastroenterite no homem a partir de estudos realizados por Appleton & Higgins (1975), em amostras fecais de recém-nascidos diarréicos hospitalizados e espécimes provenientes de surtos de gastroenterite em maternidades. Utilizando microscopia eletrônica (ME) visualizaram um vírus com dimensões e características morfológicas diferentes das do NV e do RV, ao qual atribuíram a denominação “pequenos vírus de estrutura arredondada” (*Small round structural virus* - SRSV).

Naquele mesmo ano, Madeley & Cosgrove (1975), denominaram de AstVs as partículas virais que apresentavam a forma de uma estrela de cinco a seis pontas por ME, em amostras diarréicas provenientes de crianças hospitalizadas.

Estudos posteriores demonstraram a infecção de mamíferos e aves por esses vírus com manifestações clínicas que incluem hepatite hemorrágica e fatal observada em patos (MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

1.2 A PARTÍCULA VIRAL E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Os AstVs não possuem envelope, são esféricos, com diâmetro de 28-30 nanômetros (nm) e estrutura morfológica arredondada com um core em forma de estrela sólida de cinco ou seis pontas (Figura 1A). No entanto, apenas 5-10% das partículas apresentam essa morfologia por ME, o que, muitas vezes, dificulta a sua identificação (MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

O diâmetro das partículas de AstVs pode variar dependendo da sua origem e do método de preparação usado para a ME. Verificou-se que os HAstV-2 propagados em cultivos celulares epiteliais de rim de macaco Rhesus (LLCMK2) na presença de tripsina, exibem partículas com simetria icosaédrica e projeções bem definidas que protrudem da superfície, alcançando o diâmetro de 41nm. Quando submetidos a tratamento alcalino (pH 10,0) as partículas virais se transformam e apresentam a morfologia estelar típica (RISCO et al., 1995; MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

Análises realizadas por criomicroscopia eletrônica em partículas virais de HAstV-1 demonstraram um capsídeo sólido e de superfície ondulada de 33 nm de diâmetro, exibindo 30 projeções diméricas com 5 nm (Figura 1B) (MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

A caracterização dessas partículas com relação a sua composição protéica é importante, considerando que este fator é determinante na infectividade específica das partículas e pode influenciar na estrutura do vírus (BASS & QIU, 2000; MENDEZ et al., 2002).

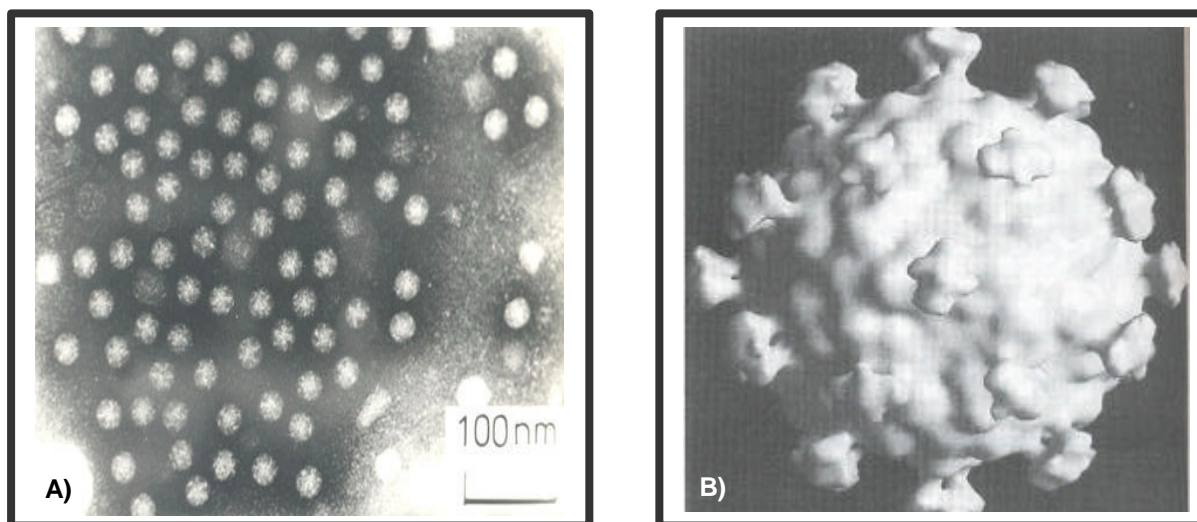


Figura 1 – Astrovírus humano. A) Microscopia eletrônica das partículas de astrovírus, demonstrando seu aspecto estelar (*The Electron Microscopy Unit, Public Health Laboratory, Bristol, UK*). B) Criomicroscopia eletrônica com processamento computacional de imagem, evidenciando a forma tridimensional dos astrovírus humanos (MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

O genoma dos HAsVs é constituído de ácido ribonucléico (RNA), fita simples (ssRNA), polaridade positiva, com aproximadamente 7.000 nts, composto por três fases abertas de leitura (*Open reading frame*): ORF1a, ORF1b e ORF2. Duas regiões terminais não-codificadoras estão presentes nas extremidades 3' e 5' do genoma (MÉNDEZ & ARIAS, 2007) (Figura 2). Na extremidade 3' observa-se um RNA subgenômico com 2.484 nt e uma cauda poliadenilada (poli A), porém pouco se conhece da extremidade 5' do genoma (MONROE et al., 2005).

As ORF1a e ORF1b contêm seqüências altamente conservadas, estão situadas próximas à extremidade 5' do genoma e codificam as proteínas virais não-estruturais, serino-protease (Pro) e RNA polimerase-RNA dependente (Pol), respectivamente (JIANG et al., 1993; WILLCOCKS et al., 1994). A região de superposição observada entre essas ORFs abrange 60 a 70 nt e é altamente conservada entre os distintos sorotipos (MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

O RNA genômico dos AstVs funciona como RNA mensageiro (mRNA) para a síntese das proteínas não-estruturais, sendo traduzido em duas poliproteínas. Uma é codificada exclusivamente pela ORF1a (NsP1a, 103 quilodaltons - kDa), enquanto que a outra por ambas as ORFs, 1a e 1b (NsP1ab, 160 kDa); esta última gerada como resultado de um mecanismo de mudança da matriz de leitura traducional (*frameshift*). Ambas poliproteínas não-estruturais são auto-processadas

por uma protease viral codificada pela ORF1a e estão envolvidas no processo de replicação (WILLCOCKS et al., 1999; MÉNDEZ-TOSS et al., 2000) (Figura 2).

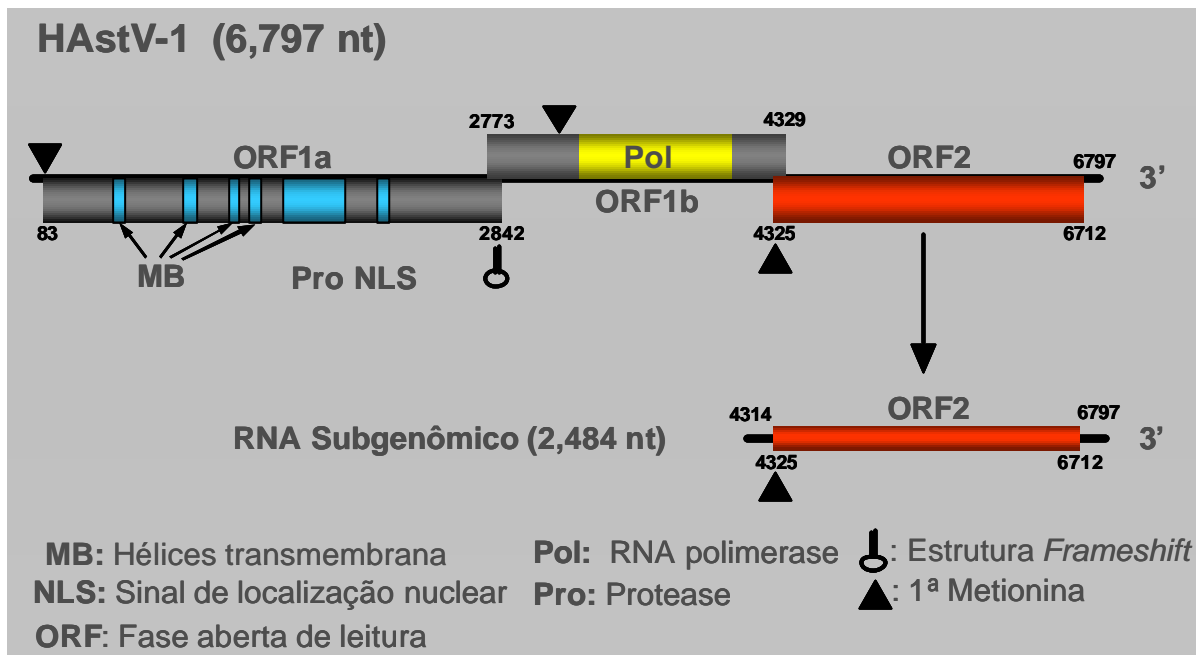


Figura 2 – Diagrama esquemático da organização do genoma e regiões relacionadas à replicação do astrovírus humano tipo 1 (HAstV-1). A ORF2 é expressa a partir do RNA subgenômico detectado no citoplasma de células infectadas (adaptado de MONROE et al., 2005).

A ORF2 está localizada próxima à extremidade 3' do genoma, possui de 2.316 a 2.391 nt e codifica a proteína precursora do capsídeo viral, utilizada na classificação dos AstVs. Consiste em uma ORF comum tanto ao RNA genômico quanto ao subgenômico (MONROE et al., 1993; LEWIS et al., 1994) (Figura 2). A proteína estrutural codificada pela ORF2 é traduzida a partir do RNA subgenômico, o qual é sintetizado durante a replicação do vírus, sendo este colinear à porção do terço 3' do RNA genômico (MÉNDEZ-TOSS et al., 2000; GEIGENMÜLLER et al., 2002a).

A região C-terminal da poliproteína NsP1a, denominada NsP1a/4, contém uma região hipervariável que está localizada junto à membrana do retículo endoplasmático (RE) e ao RNA viral, o que sugere seu envolvimento no processo de replicação do RNA (GUIX et al., 2005). Uma deleção de 45 nt dentro da região hipervariável foi descrita por Willcocks et al. (1994), e estaria associada à adaptação e replicação do HAstV em certas linhagens celulares. Em HAstVs isolados a partir de

amostras fecais, esta deleção pode influenciar na eficiência da replicação do RNA viral (GUIX et al., 2005).

Recentemente se relatou que a proteína não-estrutural P38, derivada da ORF1a, induz a apoptose da célula hospedeira, exacerbando a replicação viral e conseqüente liberação das partículas (GUIX et al., 2004; MÉNDEZ et al., 2004; KRISHNA, 2005).

Produtos protéicos de 145, 85 e 57 kDa foram detectados utilizando-se anticorpos anti-NsP1ab, sendo as duas primeiras proteínas intermediárias no processo da NsP1ab, enquanto a de 57 kDa representa a RNA-polimerase viral madura (MÉNDEZ et al., 2003).

A proteína estrutural dos HAstVs, codificada pela ORF2, é sintetizada principalmente a partir do RNA subgenômico. No processo de maturação, a proteína precursora (87 a 90 kDa) do capsídeo viral é modificada após a tradução, sendo capaz de agrupar-se para formar as partículas virais, revestindo o genoma. No entanto, a clivagem proteolítica dessa proteína (70 kDa), desencadeada pelas enzimas caspases, é necessária para tornar as partículas virais infectantes, conduzindo à apoptose das células infectadas e conseqüente liberação das partículas virais (GUIX et al., 2004; MÉNDEZ et al., 2004). O processo de conversão da proteína viral (VP) 90 em VP70 é importante para a liberação do vírus das células infectadas (MÉNDEZ et al., 2004).

Ainda existem controvérsias sobre como ocorre o processamento dos produtos primários obtidos quando da tradução da proteína precursora. Entretanto, com relação aos produtos finais, de 32-34 kDa, 27-29 kDa e 24-26 kDa, isto já está bem definido, considerando achados com diferentes tipos de AstV (MONROE et al., 1991; SANCHEZ-FAUQUIER et al., 1994; BELLLOT et al., 1997a; BASS & QUI, 2000; GEIGENMÜLLER et al., 2002b; MENDEZ et al., 2002). As proteínas de 24-29 kDa representam a região hipervariável da proteína precursora, estando provavelmente envolvidas no estágio inicial da interação do vírus com a célula hospedeira (KRISHNA, 2005). As proteínas de 32-34 kDa contêm epítomos com reação cruzada que podem demonstrar a agregação do domínio do core nas partículas maduras (KRISHNA, 2005). Acredita-se que uma única mutação no domínio do capsídeo da proteína de 34 kDa possa evitar uma apropriada adsorção do vírion (MATSUI et al., 2001).

A proteína P86, precursora da VP26, foi identificada em extrato de células infectadas por HAstV-2 pela técnica de imuno-precipitação. O seqüenciamento parcial das proteínas VP26 e VP29 confirmou que ambos os polipeptídeos são codificados pelo RNA subgenômico de 2,8 Kb. A diferença de massa molecular observada entre essas duas proteínas, e dados da seqüência parcial da região N-terminal, sustentam a idéia de que a VP29 é uma extensão amino-terminal da VP26 e desempenha um importante papel na neutralização dos HAstVs (SANCHEZ-FAUQUIER et al., 1994; BASS & UPADHYAYULA, 1997; JONASSEN et al., 2001). Sugere-se que a VP34 seja responsável pela formação da proteína de capsídeo e que VP26 e VP29 estariam relacionadas à formação das projeções, as quais estão envolvidas na ligação ao receptor (KRISHNA, 2005; MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

A porção N-terminal da proteína do capsídeo dos AstVs constitui o domínio de montagem envolvido na formação do capsídeo e encapsulamento do genoma, enquanto que a porção C-terminal forma o domínio de interação com o receptor da célula hospedeira (Krishna 2005) (Figura 3).

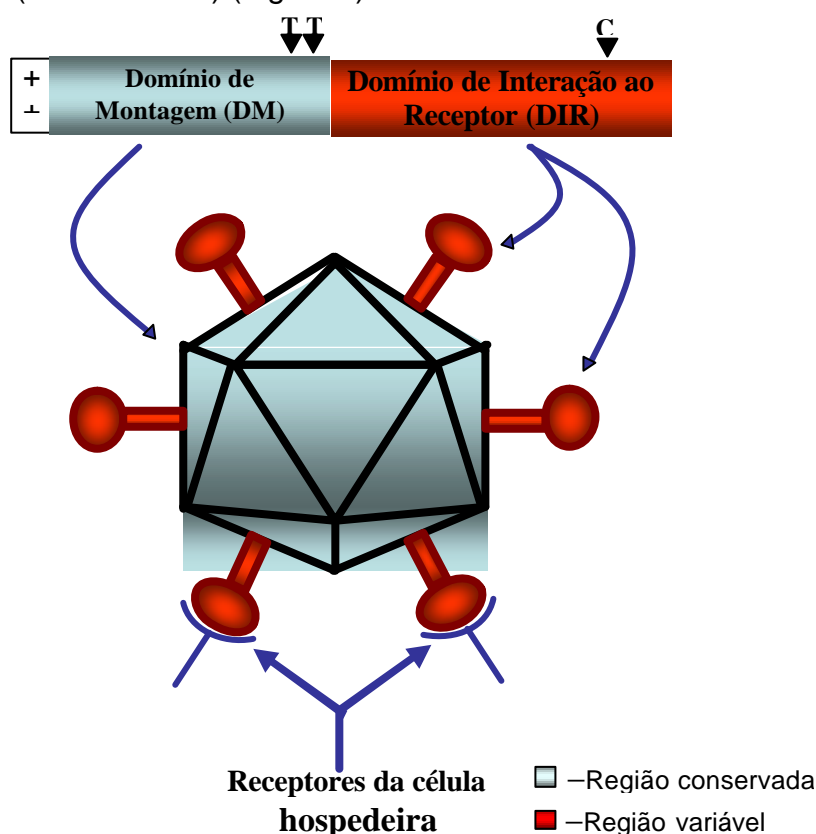


Figura 3 – Esquema dos domínios funcionais da proteína do capsídeo do AstVs. (KRISHNA 2005). **(+++)** – Região N-terminal da proteína do capsídeo relacionada ao encapsulamento do RNA viral, **(T²)** – sítio de clivagem da tripsina, **(C²)** – sítio de clivagem proposto para a caspase.

Cada sorotipo de HAstV apresenta um número específico de proteínas estruturais. Isto se deve às diferenças observadas no processamento do precursor capsídico em relação aos sítios de clivagem pela tripsina, os quais não se apresentam bem conservados. Comparando-se as extremidades N e C terminais desse precursor, verificou-se que a extremidade N é a mais conservada (WILLCOCKS et al., 1995; BASS & QIU, 2000; SAKON et al., 2000; JONASSEN et al., 2001).

As partículas de AstVs são resistentes ao pH 3,0, às temperaturas de 50°C por 1 hora e 60°C por 5 minutos, a clorofórmio e a uma variedade de detergentes e solventes lipídicos. Esses vírus se mantêm estáveis quando mantidos a baixas temperaturas (-70°C a -85°C) por um período de seis a dez anos. Quando sujeitos a repetidos ciclos de congelamento e descongelamento podem se romper e perder sua infectividade (MONROE et al., 2005; MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

Partículas de AstVs intactas apresentam uma massa específica em gradiente de cloreto de cério (CsCl) de 1,35 a 1,39 g/mL. Quando propagadas em células derivadas de carcinoma de cólon humano (CaCo-2), a massa específica varia de 1,35 a 1,32 g/mL, sendo que a faixa de maior densidade provavelmente contém as partículas virais completas e a de menor os vírions defectivos (WILLCOCKS et al., 1990; MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

1.3 CLASSIFICAÇÃO

Com base em alguns aspectos como o tamanho das partículas virais, a síntese do RNA mensageiro (RNAm) subgenômico e a composição protéica do capsídeo, os AstVs foram inicialmente classificados nas famílias *Picornaviridae* e *Caliciviridae* (CARTER, 1994). Porém, com a clonagem e o seqüenciamento do genoma, os AstVs foram classificados em uma nova família viral designada *Astroviridae*, constituída por dois gêneros, *Mamastrovirus* e *Avastrovirus* (MONROE et al., 2005) (Figura 4). No gênero *Mamastrovirus* encontram-se os AstVs que infectam o homem (HAstV-1 a HAstV-8) e outros mamíferos como bovinos (BAstV-1 e 2), felinos (FAstV-1), suínos (PAstV-1), mustelídeos (MAstV-1) e ovinos (OAstV-1). O gênero *Avastrovirus* inclui AstVs de aves como patos (DAstV-1), perus (TAstV-1, -2) e galinhas (CAstV-1), assim como o vírus causador da nefrite em galinhas (ANV-1, -2) (MONROE et al., 2005).

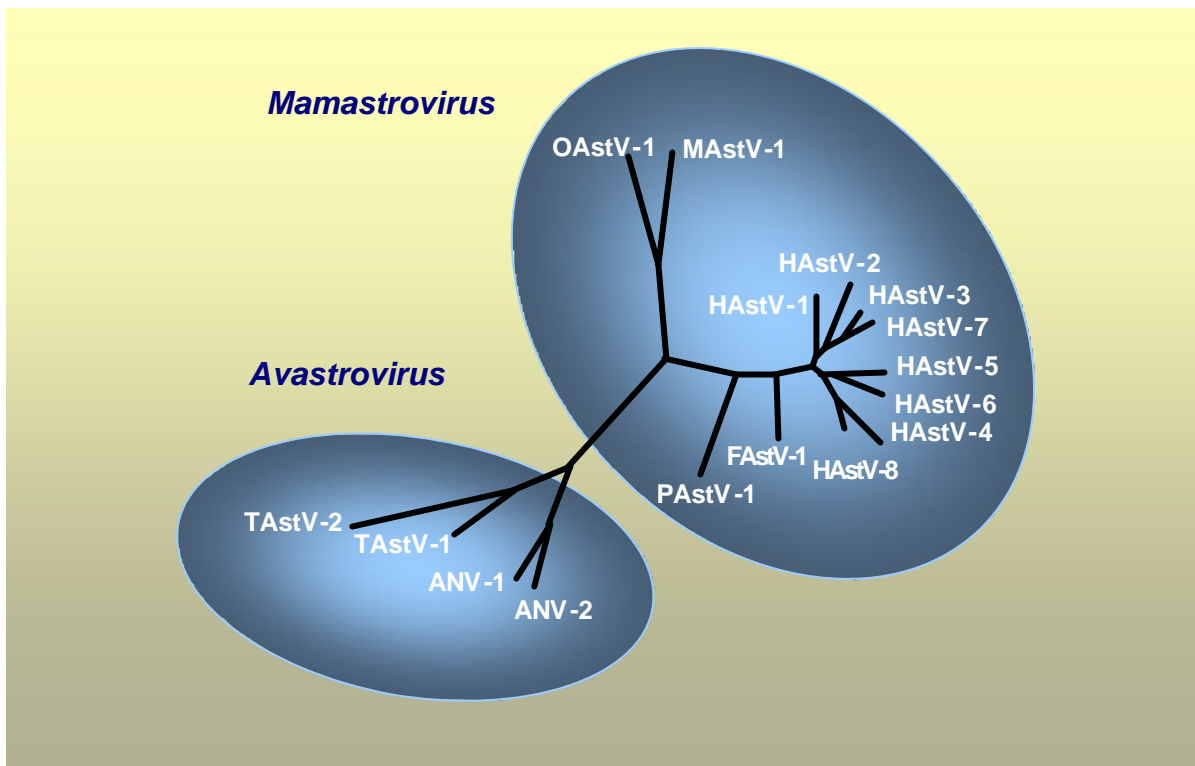


Figura 4 – Relação filogenética entre as espécies e sorotipos da família *Astroviridae*. (MONROE et al., 2005). AstV = astrovirus, HAstV = humano, MAstV = mustelídeo, FAstV = felino, OAstV = ovino, PAstV = suíno, TAstV = perus, ANV = nefrite em galináceos

1.4 EVOLUÇÃO

Estudos relacionados à história evolutiva dos AstVs demonstram a ocorrência de pelo menos duas transmissões entre espécies. Estudos filogenéticos, principalmente baseados na análise da ORF2, sugeriu que o vírus de suíno (PAstV) foi transmitido para gato (FAstV) e, destes, aos seres humanos (HAstV). Ambas as transmissões possivelmente envolveram hospedeiros intermediários, porém, ainda não identificados (JONASSEN et al., 2001; LUKASHOV & GOUDSMIT, 2002).

A análise das relações evolutivas dos HAstVs demonstrou que todas as espécies e sorotipos desse vírus representam linhagens individuais (monofiléticas) dentro da família *Astroviridae* e indicam que a separação entre as linhagens ocorreu antes que os atuais sorotipos de HAstV se estabelecessem. Essa análise foi baseada tanto em substituições sinônimas quanto não-sinônimas. Foi observado que todos os HAstVs pertencentes a uma mesma espécie ou sorotipo se agrupam,

independente do modelo filogenético utilizado ou da região do genoma analisada (LUKASHOV & GOUDSMIT, 2002).

As relações evolutivas entre os sorotipos de HAstV diferem nas três ORFs. No caso da ORF2, diversos estudos já foram realizados utilizando pequenas regiões com cerca de 300 nucleotídeos (nt) (BELLIOT et al., 1997a; WALTER et al., 2001), as quais apresentaram resultados discordantes dos obtidos em outras pesquisas que empregaram a seqüência completa de aa (WANG et al., 2001; LUKASHOV & GOUDSMIT, 2002). Essas discrepâncias indicam que relações filogenéticas baseadas em pequenas regiões nucleotídicas podem não expressar a verdadeira relação entre os HAstV.

A ORF2 apresentou alta variabilidade quando comparada às ORFs 1a e 1b. Estes dados apontam para uma evolução independente dos genes e até mesmo das regiões gênicas dos AstVs, sugerindo pressões distintas de seleção e/ou restrições evolutivas para as diferentes regiões do genoma (LUKASHOV & GOUDSMIT, 2002).

Pesquisas conduzidas por van Hemert et al. (2007) demonstram que a história evolutiva dos AstVs compreende inicialmente uma separação entre as linhagens de aves e mamíferos, seguida de diversificação entre os AstVs de mamíferos, estando incluídas neste processo diversas transmissões entre espécies. Recentemente se demonstrou que essa evolução está mais associada às mudanças na composição nucleotídica e no uso dos códons entre mamíferos não-humanos, em comparação com AstVs de seres humanos e aves. Essa recente mudança das forças evolutivas, atuando em termos de substituições sinônimas, aponta para uma adaptação do vírus após transmissões entre espécies, em relação ao uso de códons de seu novo hospedeiro.

1.5 GENOTIPOS DE HAstVs

Com base na análise da seqüência de 348 nucleotídeos de uma região da ORF2, os HAstVs foram classificados em oito genotipos (NOEL et al., 1995; MÉNDEZ & ARIAS, 2007). Tais genotipos correlacionam-se com os sete sorotipos de HAstV detectados pelas metodologias de EIA, IME e imunofluorescência (IF), utilizando-se anticorpos monoclonais e policlonais tipo-específicos (HERRMANN et al., 1988, NOEL et al., 1995). Correlação similar foi observada utilizando a reação em

cadeia pela polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR), com os oito pares de “iniciadores” de HAstV tipo-específicos (MATSUI et al., 1998; SAKAMOTO et al., 2000).

Estudos baseados na análise de uma região da ORF1a classificaram esses oito genótipos em dois genótipos: A que compreende os HAstV-1 a HAstV-5 e HAstV-8 e B que inclui os HAstV-6 e 7 (BELLIOT et al., 1997a; TAYLOR et al., 2001) (Figura 5).

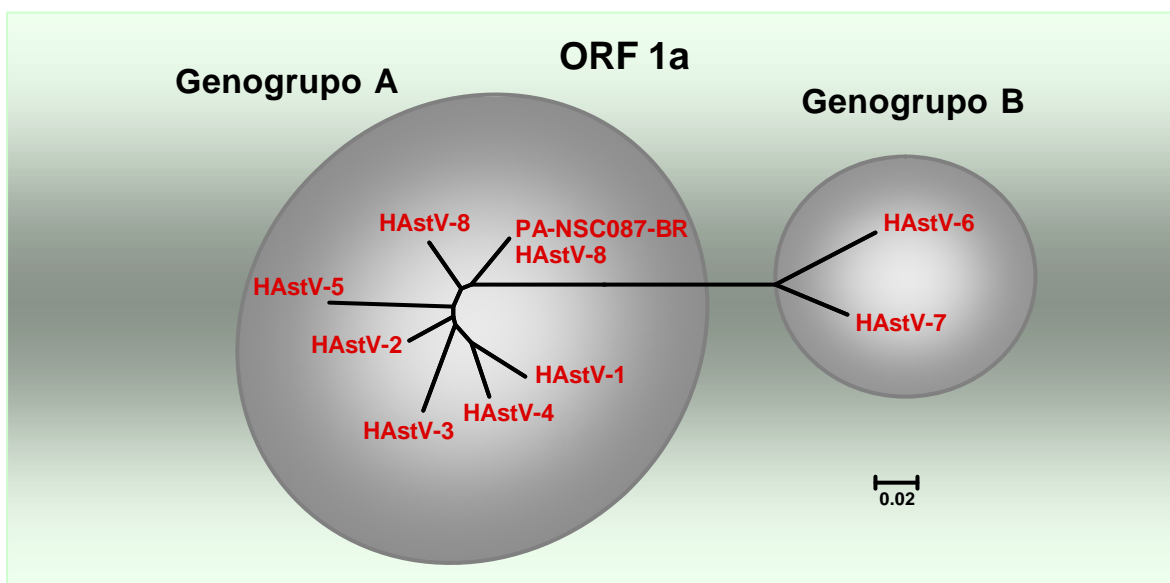


Figura 5 – Classificação dos astrovírus humanos em genótipos pela análise filogenética, com base na fase aberta de leitura 1a (ORF1a) (adaptado de GABBAY et al., 2007c). HAstV – astrovírus humano, PA-NSC087-BR – amostra detectada em Belém-PA, classificada como HAstV-8.

Porém, a análise das regiões da ORF1b (Figuras 6 e 7) e ORF2 (Figura 8) não gerou genótipos distintos (BELLIOT et al., 1997a; TAYLOR et al., 2001). Estudos de caracterização da região ORF1b realizados em uma amostra de HAstV-8 da África do Sul demonstraram significativa relação deste genótipo com o HAstV-4 (Figura 3) (TAYLOR et al., 2001). No Brasil, pesquisas conduzidas por Silva et al. (2006) revelaram que era expressiva a identidade entre os genótipos, em análise baseada na ORF1b (Figura 7).

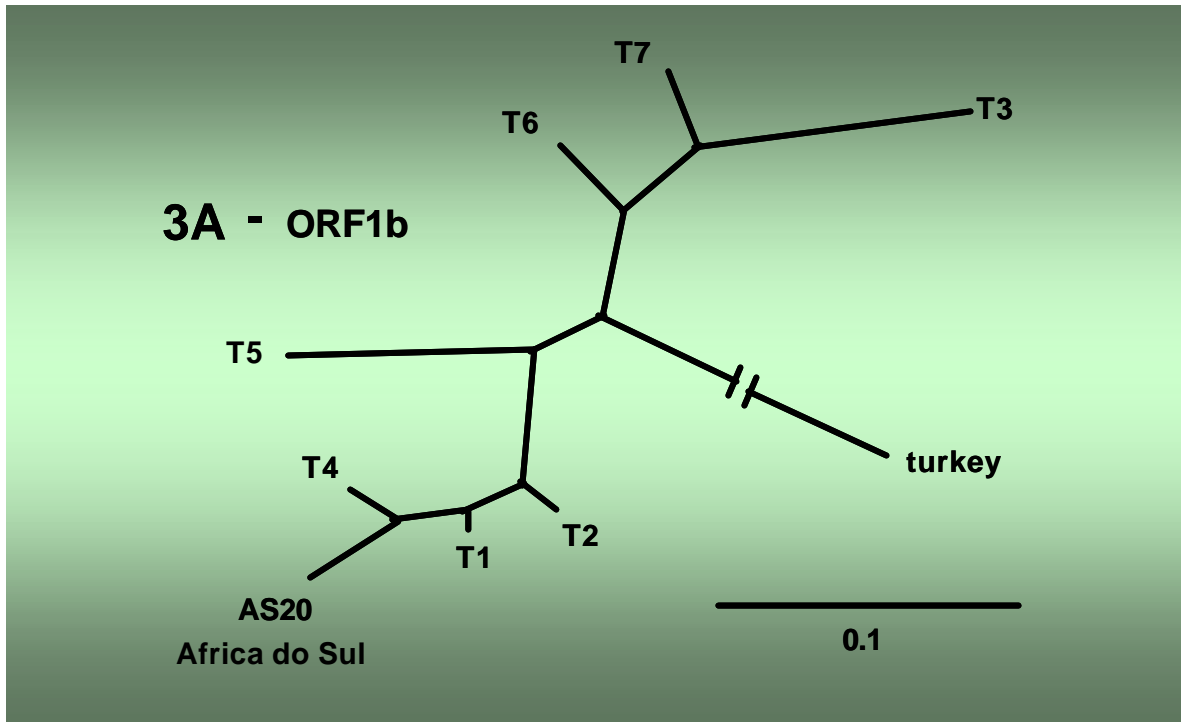


Figura 6 – Classificação dos astrovírus humanos, baseada na análise filogenética da fase aberta de leitura 1b (Taylor et al., 2001). T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7– genótipos de astrovírus, AS20 África do Sul – amostra classificada como genótipo 8, Turkey – amostra de peru.

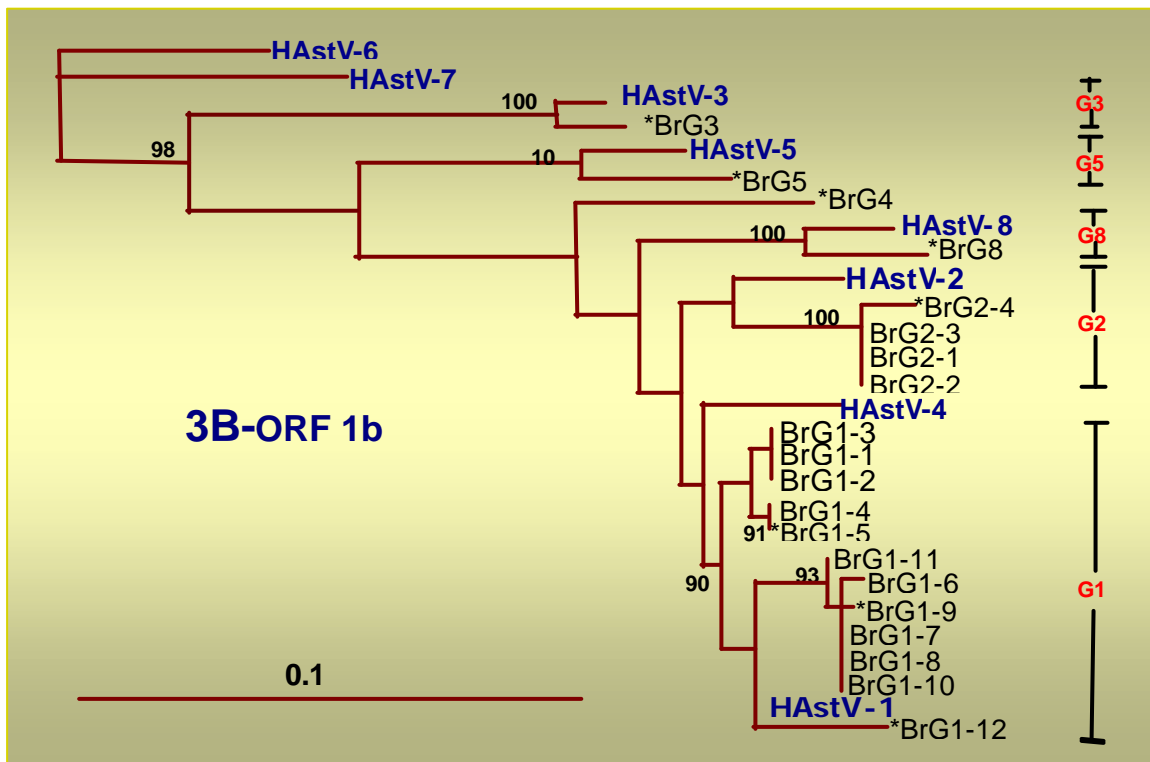


Figura 7 – Classificação dos astrovírus humanos, baseada na análise filogenética da fase aberta de leitura 1b (Silva et al., 2006). HAstV – amostras protótipos de astrovírus humano, BrG – amostras provenientes de Brasília-DF, Campo Grande-MS e Goiânia-GO.

A análise das variações de seqüências parciais da ORF2 de um mesmo genótipo classificou como nova linhagem as amostras que apresentassem pelo menos 7% de divergência (Medina et al., 2000; Guix et al., 2002) (Figura 8). Desse modo, os HAstVs-1 se distribuíram em quatro linhagens (1a, 1b, 1c e 1d), enquanto os HAstVs-2 e HAstVs-4 em duas linhagens.

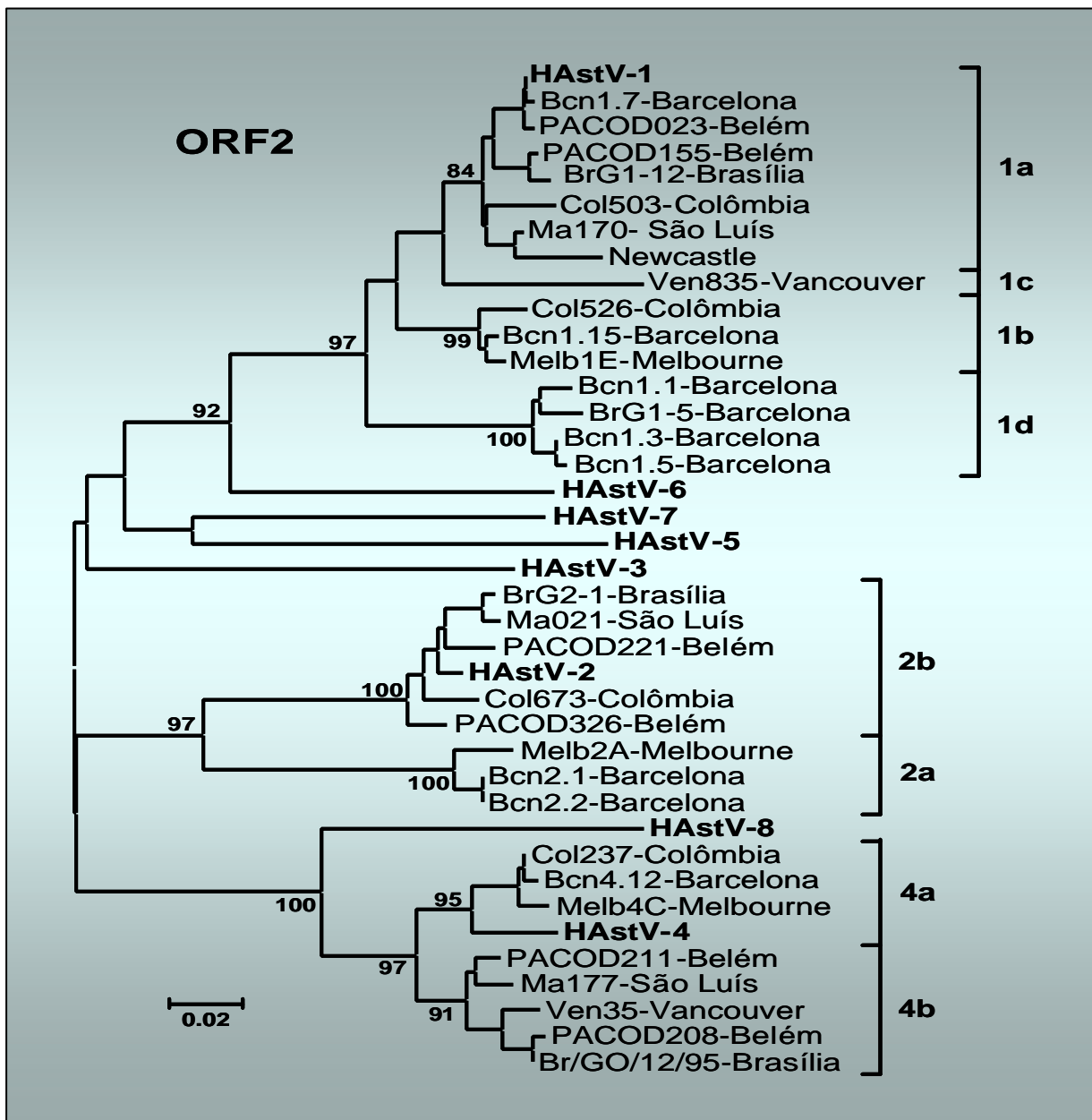


Figura 8 – Classificação dos genótipos e linhagens de astrovírus humanos, baseada na análise filogenética da fase aberta de leitura 2 (adaptado de GABBAY et al., 2007b). HAstV: amostras protótipos de astrovírus humano, as demais amostras apresentam o nome e local de origem.

1.6 PATOGÊNESE E PATOLOGIA

1.6.1 Transmissão

Os HAstVs são transmitidos principalmente pela via fecal-oral, como demonstrado em estudos envolvendo voluntários (KURTZ et al., 1979; MIDTHUN et al., 1993). A excreção desses vírus nas fezes pode persistir por um período de até duas semanas em pessoas higidas. Porém, nos pacientes imunocomprometidos os HAstVs já foram detectados até três meses após a resolução dos sintomas (CUBBIT et al., 1999; PENNAP et al., 2002). Essa via de transmissão pode ocorrer tanto diretamente como por fômites e/ou pessoas infectadas (ABAD et al., 2001).

A transmissão pessoa-a-pessoa incide principalmente entre crianças, envolvendo os familiares e ocupantes de enfermarias e hospitais pediátricos, onde a infecção se comporta quase sempre de forma endêmica (LEBARON et al., 1990). É importante ressaltar que os HAstVs podem ser excretados por indivíduos assintomáticos, o que amplia a sua transmissibilidade (MADELEY & COSGROVE, 1975; ASHLEY et al., 1978). Esses vírus também já foram associados a casos de diarreia nosocomial (DENNEHY et al., 2001; RODRIGUEZ-BAEZ et al., 2002).

O consumo de água e alimentos contaminados, especialmente frutos-do-mar – ostras cruas, mexilhão e mariscos coletados em áreas poluídas por esgoto com efluentes de origem humana – exerce papel importante na disseminação dos HAstVs, principalmente nas situações epidêmicas (KURTZ & LEE, 1987; LE GUYADER et al., 2000; MIOSSEC et al., 2000; TAYLOR et al., 2001).

A presença de HAstVs foi demonstrada em resíduos biológicos sólidos de esgoto e nas amostras coletadas na entrada da rede de tratamento (CHAPRON et al., 2000; NADAN et al., 2003; LE CANN et al., 2004). Esses vírus foram também detectados em águas tratadas, demonstrando com isso que os HAstVs não são efetivamente eliminados (MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

1.6.2 Replicação Viral

Ainda são restritos os achados sobre os mecanismos fisiológicos relacionados às gastroenterites pelos AstVs, assim como os mecanismos de replicação viral *in vitro*.

Estudos por ME demonstraram que, apesar da ligação a qualquer parte da membrana celular durante a penetração, os AstVs se ligam preferencialmente por extensões celulares como estruturas similares a pseudópodos e microvilosidades (DONELLI et al., 1992). Acredita-se que o fenômeno de endocitose seja o mecanismo mais provável de entrada dos AstVs em células suscetíveis. A penetração viral parece ocorrer a partir da formação de invaginações revestidas por clatrina que foram observadas na base ou na proximidade de extensões celulares. Esse fenômeno direciona as partículas ao interior da membrana plasmática ou das vesículas de fagolisossomos, formando posteriormente grandes vacúolos no citoplasma e iniciando o processo replicativo. O desnudamento viral e transporte do RNA pelo citoplasma podem ser um processo mediado por pH, o qual se inicia nos endossomos e/ou lisossomos (DONELLI et al., 1992).

Estudos realizados em diferentes linhagens celulares demonstraram que o tratamento prévio dos AstVs com a tripsina pode aumentar em até cinco vezes o potencial de infecção viral (DONELLI et al., 1992; SANCHEZ-FAUQUIER et al., 1994; MUSTAFA et al., 1998; BASS & QIU, 2000; MENDEZ et al., 2002).

1.6.3 Patogenia viral

Até o momento pouco se sabe a respeito da patogenia dos AstVs, ou quais os fatores do hospedeiro envolvidos tanto na liberação viral como na resolução da doença (KOCI et al., 2003). Estudos experimentais já foram realizados em ovinos, bovinos e aves (MOSER & SCHULTZ-CHERRY, 2005; MÉNDEZ & ARIAS, 2007). Embora limitados, esses trabalhos elucidaram alguns aspectos sobre o mecanismo da infecção e doença pelos AstVs.

Em seres humanos vários estudos envolvendo voluntários já foram realizados com o intuito de determinar a presença e frequência das manifestações clínicas e a magnitude da excreção viral (MOSER & SCHULTZ-CHERRY, 2005). Em indivíduos sintomáticos, partículas de HAstVs foram detectadas no epitélio basal das vilosidades, na superfície epitelial a partir de biópsias planas e em macrófagos da lâmina própria (MITCHELL, 2002). A infecção parece estar restrita às vilosidades dos enterócitos e ao epitélio exposto (PHILLIPS et al., 1982).

O relato dos achados obtidos em uma criança receptora de medula óssea humana, que apresentou diarreia grave por HAstV, demonstrou que a replicação viral envolveu os enterócitos que recobrem dois terços da região apical das

vilosidades do intestino delgado, com a liberação de partículas virais por descamação no lúmen intestinal (SEBIRE et al., 2004). A coloração por imunohistoquímica revelou um aumento progressivo dos HAstVs no intestino delgado, com uma infecção mais extensa no jejuno, se comparado ao duodeno. Não se demonstrou qualquer envolvimento gástrico. Anormalidades morfológicas detectadas no intestino sugerem que, apesar da diarreia grave, a resposta inflamatória não está inicialmente envolvida na patogênese desses vírus (SEBIRE et al., 2004; MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

A falta de informações adicionais sobre a histopatologia na infecção por HAstV deveu-se, em parte, à ausência de um animal de pequeno porte que servisse de modelo para melhor entender-se a doença causada por esses vírus. Mais recentemente foi isolado de aves um novo AstV que causa mortalidade por uma síndrome entérica observada em um grupo de perus, sendo que esse vírus (TAstV-2) tem sido utilizado em recentes estudos sobre replicação e propagação sistêmica do AstV (KOCI et al., 2000, 2003 e 2004; BEHLING-KELLY et al., 2002;).

1.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os HAstVs acometem principalmente crianças menores de 5 anos de idade. Seu período de incubação varia de um a quatro dias, podendo ser de 24-36 horas em surtos de gastroenterite aguda e nos casos secundários (KONNO et al., 1982; MITCHELL, 2002).

A infecção pelos HAstVs induz uma diarreia aguda moderada (fezes líquidas), que dura de 2 a 3 dias, estando associada a outros sintomas como vômitos, febre, anorexia, dor abdominal e desidratação leve a moderada (DENNEHY et al., 2001; GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2001; GUIX et al., 2002; WALTER & MITCHELL 2003). A diarreia induzida pelos HAstVs geralmente tende a ser leve e autolimitada, não requerendo hospitalização e se resolvendo espontaneamente na maioria dos casos (KURTZ et al., 1979; MOSER & SCHULTZ-CHERRY, 2005). Porém, diarreia protraída foi associada com uma amostra de HAstV-3 (CABALLERO et al., 2003).

Crianças maiores de 5 anos, podem exibir manifestações clínicas como dor de cabeça, febre e náusea. Os adultos normalmente possuem anticorpos, porém a imunidade se mostra apenas parcial, sendo que uma diarreia moderada pode ser induzida em voluntários (KURTZ et al., 1979; COOK & MYINT, 1995). Pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV -1) e indivíduos idosos

parecem ser mais susceptíveis a desenvolver uma infecção sintomática (GRAY et al., 1987; LEWIS et al., 1989; GROHMANN et al., 1993; GIORDANO et al., 1999; GALLIMORE et al., 2005). Evidências também indicam a participação dos HAstVs nos quadros de gastroenterite em crianças e adultos que sofreram transplante de medula óssea (COX et al., 1994; CUBITT et al., 1999).

O período de excreção do vírus geralmente é curto, variando de três a cinco dias. Nos pacientes idosos e principalmente naqueles com deficiência imunológica, a excreção torna-se prolongada, podendo persistir por até três meses após a resolução dos sintomas (BLACK, 1993; CUBITT et al., 1999; WALTER & MITCHELL, 2003).

Infecção nosocomial por HAstV representa um importante problema de saúde pública e sua prevalência e transmissibilidade pode estar relacionada aos pacientes assintomáticos que eliminam os HAstVs nas fezes, como também à contaminação ambiental devido à relativa resistência desses vírus aos desinfetantes normais (FORD-JONES et al., 1990; ESAHLI et al., 1991; SHASTRI et al., 1998; UNICOMB et al., 1998; RODRIGUEZ-BAEZ et al., 2002; MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

Casos de co-infecção dos HAstVs com RV e CV dificultam a avaliação dos sintomas clínicos (CHIKHI-BRACHET et al., 2002; GUIX et al., 2002; MARIE-CARDINE et al., 2002; RODRIGUEZ-BAEZ et al., 2002). Em geral, a gravidade das infecções por HAstVs é menor em relação aos demais vírus entéricos, sendo que a sua relação com o sorotipo infectante ainda não está plenamente elucidada. Deve-se levar em consideração, porém, o número de crianças afetadas e não a gravidade dos sintomas desencadeados por esses patógenos (CHIKHI-BRACHET et al., 2002; DALTON et al., 2002; WALTER & MITCHELL, 2003). Mortes associadas à infecção por HAstV são extremamente raras mas já foram relatadas (SINGH et al., 1989).

Os AstVs também estão relacionados a outras condições clínicas em animais, destacando-se uma hepatite grave que ocorre em patos, com grande mortalidade e que varia conforme a idade (GOUGH et al., 1984). O ANV, agente etiológico da nefrite intersticial, retarda o crescimento de galinhas jovens (IMADA et al., 2000).

1.7.1 Imunidade

Ainda são desconhecidos os reais mecanismos de imunidade nas infecções pelos HAstVs. Acredita-se que haja uma maior suscetibilidade entre as crianças e idosos, considerando-se as diversas epidemias estudadas até o presente. Supõe-se que adultos jovens possuam anticorpos protetores que provavelmente confirmam resistência à reinfecção, mas que declinam progressivamente com o tempo (LEBARON et al., 1990, WILHELMI et al., 2003).

Os HAstVs normalmente infectam crianças menores de 5 anos de idade, provavelmente devido à perda dos anticorpos maternos ou a exposição mais precoce e que, freqüentemente, varia com a localização geográfica e as condições demográficas da população (RODRIGUEZ-BAEZ et al., 2002; WALTER & MITCHELL, 2003). Estudos de soroprevalência demonstram que aos 6 meses crianças possuem baixos níveis de anticorpos (10% - 14%), que aumentam aos 5 anos de idade (62% - 90%) (MIDTHUN et al., 1993; KRISTON et al., 1996; MENDES, 1997; MITCHELL, 2002).

A freqüência de reinfecção e a probabilidade da mesma evoluir para uma forma sintomática ainda são desconhecidas. Voluntários infectados experimentalmente com HAstV e que possuíam anticorpos circulantes não desenvolveram quadro clínico, mas apresentavam excreção de partículas virais (KURTZ et al., 1979; MIDTHUN et al., 1993). Considerando esses achados e o fato de que até então ainda não se relataram episódios subseqüentes de diarreia causados pelo mesmo genótipo em uma mesma criança, alguns autores sustentam a hipótese da imunidade homotípica (NAFICY et al., 2000). Além disso, observações epidemiológicas sugerem que as infecções pelo HAstV, não induzem imunidade heterotípica, uma vez que um episódio de diarreia por HAstV não determina uma redução na incidência de outros subseqüentes (BASS & UPADHYAYULA, 1997; NAFICY et al., 2000).

Observações clínicas e estudos em voluntários têm demonstrado o relevante papel da resposta imune humoral e sugerem que os anticorpos neutralizantes parecem limitar a infecção. Estudos envolvendo biópsias de intestino humano indicam que a imunidade celular, especificamente a relacionada às células T CD4 (+), também pode estar envolvida na resposta aos HAstVs. Apesar de não se dispor de um modelo animal adequado, os estudos "in vivo" têm sugerido o papel

potencial da resposta imune mediado por células no controle das infecções (KOCI, 2005).

1.8 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A ME se constituiu como uma ferramenta pioneira para o diagnóstico das infecções por HAstVs, tanto pelo método direto de visualização das partículas em amostras fecais, quanto pela agregação dos *vírions* com soro convalescente (ASHLEY et al., 1978; KONNO et al., 1982). A típica configuração estelar dos AstVs, que facilita sua identificação, só é observada em aproximadamente 10% das partículas virais detectadas. Porém, que esta técnica exige experiência e uma interpretação precisa por parte do técnico responsável (RÁCZ, 2004; MÉNDEZ & ARIAS, 2007). É uma metodologia ainda utilizada no diagnóstico desses vírus, permitindo a detecção de co-infecções com outros patógenos virais no mesmo espécime clínico.

Quando inoculados em cultivos celulares, os HAstVs apresentam uma replicação limitada, porém, após a adição de tripsina ao meio de manutenção (10 µg/mL) observou-se um aumento na sua infectividade (MÉNDEZ & ARIAS, 2007). Os primeiros cultivos utilizados para o isolamento dos AstVs foram os provenientes de células primárias de rim de embrião humano (HEK). Posteriormente, os mesmos foram adaptados tanto em linhagem contínua de células de rim de macaco Rhesus (LLC-MK2), como nas primárias renais de símio Baboon (PBK), com grande potencial infectante (LEE & KURTZ, 1981). A identificação do antígeno viral é feita por imunofluorescência (IF), usando soro humano convalescente.

Mais recentemente, células de hepatoma humano (PLC/PRF/5), rim fetal de macaco verde africano (MA-104) e linhagem contínua de carcinoma de cólon humano (T84) foram incluídas para o isolamento dos HAstVs, porém, menos sensíveis quando comparadas à célula CaCo-2 (TAYLOR et al., 1997; BRINKER et al., 2000).

O isolamento dos AstVs diretamente de fezes permitiu a obtenção de anticorpos policlonais e monoclonais grupo-específicos (HERRMANN et al., 1988) importantes para utilização em diferentes técnicas de diagnóstico.

O desenvolvimento de EIAs usando anticorpos monoclonais e policlonais possibilitou uma maior sensibilidade na detecção dos HAstVs, proporcionando a

análise simultânea de um grande número de amostras (HERMMANN et al., 1990; GLASS et al., 1996; SHASTRI et al., 1998; WALTER & MITCHELL, 2003). Atualmente, kits que utilizam anticorpos monoclonais grupo-reativos na captura dos antígenos de HAstV em espécimes clínicos se encontram comercialmente disponíveis (HERRMANN et al., 1990; GLASS et al., 1996). Um EIA para sorotipar HAstVs, baseado na utilização de anticorpos específicos para os oito sorotipos de HAstVs também foi desenvolvido (NOEL et al., 1995).

Os testes de aglutinação com partículas de látex, que são métodos simples, rápidos, específicos, menos dispendiosos e possibilitam o processamento de um grande número de amostras, estão em desenvolvimento. Porém, estudos complementares são necessários para aumentar a sensibilidade (KOMORIYA et al., 2003).

Com o advento da biologia molecular, outras técnicas têm sido empregadas para a detecção do genoma viral como a RT-PCR e hibridização *dot-blot*. A técnica de RT-PCR tem sido utilizada como método de triagem para detecção dos HAstVs em espécimes fecais provenientes de estudos epidemiológicos devido à sua maior sensibilidade em relação ao EIA (BERECIARTU et al., 2002; MARIE-CARDINE et al., 2002). Todavia, resultados falso-positivos já foram observados (SILVA et al., 2001; TAI et al., 2003; GRIMM et al., 2004).

Diversos protocolos de RT-PCR já foram descritos e visam amplificar a região genômica conservada que codifica as proteínas não-estruturais (ORF1a) (DALTON et al., 2002; GUIX et al., 2002) e região codificadora do capsídeo (5' ou 3' da ORF2), que detecta os oito tipos de HAstV (NOEL et al., 1995; WALTER et al., 2001; OH et al., 2003). Os métodos de genotipagem usando a RT-PCR e seqüenciamento são baseados nessa variabilidade (NOEL et al., 1995) utilizando-se iniciadores tipo-específicos (MATSUI et al., 1998; MITCHELL et al., 1999b; SAKAMOTO et al., 2000; WALTER et al., 2001).

O seqüenciamento, parcial ou completo do genoma viral, tem sido uma ferramenta muito empregada nos estudos de epidemiologia molecular das infecções pelos HAstVs, permitindo a avaliação dos tipos circulantes, das variações genéticas, a detecção de prováveis reinfecções e análise de fatores evolutivos envolvendo tanto AstVs humanos como de animais (MEDINA et al., 2000; GUIX et al., 2002; ESPUL et al., 2004; SILVA et al., 2006).

Com o intuito de se ampliar a sensibilidade na detecção de HAstV, tanto nos espécimes clínicos quanto em amostras de água ambientais, técnicas de cultivo celular e RT-PCR (ICC/RT-PCR) vem sendo utilizadas em combinação com resultados promissores (MUSTAFÁ et al., 1998; CHAPRON et al., 2000; GRIMM et al., 2004).

A técnica de amplificação baseada na seqüência do ácido nucléico (NASBA) pode ser útil em estudos de campo e do meio ambiente, por ser rápida e não necessitar de equipamentos específicos; porém, esta técnica requer a utilização de um RNA de alta qualidade e *primers* específicos para a mesma (TAI et al., 2003).

O teste de RT-PCR competitivo emprega simultaneamente pares de iniciadores específicos para cada genogrupo e um RNA padrão interno (CI) e é útil na quantificação dos HAstVs dos genogrupos A e B, tanto em água potável como em esgoto (MORSY EL-SENOUSY et al., 2007).

Uma RT-PCR multiplex para a detecção simultânea de diferentes patógenos associados a infecções entéricas já foi desenvolvido (YAN et al., 2003; BEURET, 2004; ROHAYEM et al., 2004).

Recentemente, alguns laboratórios têm empregado a técnica de RT-PCR em tempo real, que é mais sensível e detecta pequenas concentrações desses vírus. Além disso, este ensaio requer uma única etapa, o que minimiza o tempo de detecção, evita possíveis riscos de contaminação e fornece a carga viral (ROYUELA et al., 2006).

Embora os testes que detectam anticorpos para HAstV sejam úteis em investigações epidemiológicas (KRISTON et al., 1996; KOOPMANS et al., 1998; MITCHELL et al., 1999a), aqueles capazes de identificar rapidamente e com precisão o antígeno viral são de maior relevância para a clínica (MATSUI & GREENBERG, 2001).

1.9 EPIDEMIOLOGIA

Estudos recentes confirmam a importância dos HAstVs como enteropatógenos de distribuição global, sendo considerados a segunda ou terceira causa de gastroenterite viral, tanto em âmbito hospitalar como ambulatorial (BERECIARTU et al., 2002; CUNLIFFE et al., 2002; DALTON et al., 2002. RODRIGUEZ-BAEZ et al., 2002; OKITSU-NEGISHI et al., 2004, MÉNDEZ & ARIAS,

2007). Em geral, a taxa de prevalência, no âmbito hospitalar, varia entre 2% a 16% e na comunidade de 5% a 17% (POLOMBO & BISHOP, 1996; WALTER & MITCHELL, 2000; MÉNDEZ-TOSS et al., 2004).

A ocorrência de extensos surtos de diarreia associados com infecção por HAstVs já foi relatada em creches, jardins-de-infância e escolas (KONNO et al., 1982; OISHI et al., 1994; MITCHELL et al., 1999b; SILVA et al., 2001), em asilos e entre militares (WATKINS, 1984; GRAY et al., 1987; BELLLOT et al., 1997b; MARSHALL et al., 2007). Surtos relacionados ao consumo de água e alimentos contaminados também foram descritos (OISHI et al., 1994; MIOSSEC et al., 2000; TAYLOR et al., 2001).

Esses agentes foram reconhecidos como uma causa freqüente de diarreia nosocomial (UNICOMB et al., 1998; RODRIGUEZ-BAEZ et al., 2002), importantes na infecção de pacientes imunocomprometidos hospitalizados (adultos e crianças), principalmente aqueles submetidos a transplantes ou infectados pelo HIV-1, cuja doença normalmente, evolui com maior gravidade e apresentam um período de excreção viral prolongado (GROHMANN et al., 1993; COX et al., 1994; SHASTRI et al., 1998; CUBITT et al., 1999; TREVIÑO et al., 2001; SEBIRE et al., 2004).

A distribuição por faixa etária das infecções pelos HAstVs pode variar de acordo com a localização geográfica e as condições demográficas da população. Estudos realizados na Espanha e França, entre crianças hospitalizadas demonstraram que as infecções por HAstVs ocorram principalmente entre menores de 3 anos (GUIX et al., 2002; MARIE-CARDINE et al., 2002). Dados similares foram obtidos a partir de pesquisas realizadas em outros países como Egito, Itália, Argentina Colômbia e Venezuela (MEDINA et al., 2000; NAFICY et al., 2000; DE GRAZIA et al., 2004; GIORDANO et al., 2004).

A incidência dos HAstVs nos quadros de gastroenterite aguda foi registrada a partir de diversos estudos conduzidos em países asiáticos e na Oceania (4% a 11%), África (2% a 9%), Continente Europeu (3% a 7%), América Latina (4% a 17%) e Estados Unidos (3% a 10%) (SANTOS & CARDOSO, 2005).

No Brasil, a maioria dos estudos tem sido conduzida em hospitais públicos. A primeira detecção dos HAstVs ocorreu a partir das fezes diarreicas de uma criança que concomitantemente, excretava rotavírus (NOZAWA et al., 1985). Pesquisas realizadas no Rio de Janeiro, São Paulo e Recife, detectaram esses vírus

por meio da ME, em espécimes fecais de crianças portadoras de quadro diarréico agudo (LINHARES et al., 1990; LEITE et al., 1991; STEWIEN et al., 1991; TIMENETSKY et al., 1993). Esses agentes foram incriminados como causa de um surtos de gastroenterite (intrafamiliar e creche) ocorridos no sudeste do país, sendo o da creche caracterizado por seqüenciamento como HAstV-1 (TANAKA et al., 1994; SILVA et al., 2001).

O padrão de sazonalidade das infecções por HAstVs ainda se mostra um tema controverso, parecendo variar de acordo com a região geográfica analisada (WALTER & MITCHELL, 2003). Nos países de clima temperado observa-se maior incidência durante o inverno e a primavera. Já nos países de clima tropical, incide mais expressivamente no período chuvoso ou na época mais quente (WALTER & MITCHELL, 2003; MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

Dos oito sorotipos/genotipos de HAstVs detectados até então, o HAstV-1 é o mais freqüente, seguido do HAstV-2, HAstV-3, HAstV-4 e HAstV-5 (LEE & KURTZ, 1994; GLASS et al., 1996; MUSTAFA et al., 2000; SAKAMOTO et al., 2000). Os genotipos 6, 7 e 8 são mais raramente detectados; porém o aumento na sensibilidade dos testes incrementou a freqüência das detecções, como o ocorrido com os HAstV-8 (CHIKHI-BRACHET et al., 2002; CUNLIFFE et al., 2002; GUIX et al., 2002; MENDEZ et al., 2002; WALTER & MITCHELL, 2003; VICTORIA et al., 2007).

Pesquisas realizadas no Brasil demonstraram um padrão similar, com predominância do HAstV-1 e menos freqüência na ocorrência de HAstV-2 a HAstV-5 e HAstV-8 (SILVA et al., 2001; CARDOSO et al., 2002; SILVA et al., 2006; VICTORIA et al., 2007).

1.10 TRATAMENTO

Até o presente, não existe uma terapia antiviral nem vacina disponível para os HAstVs. Em geral, a gastroenterite aguda causada por esses vírus é leve e autolimitada, podendo, em certas ocasiões, até interromper as atividades individuais, sem a necessidade, no entanto, de uma terapia específica.

O tratamento visa prevenir ou tratar uma possível desidratação causada pelos vômitos e diarréia essencialmente, a partir da reposição hidroeletrólítica, via oral ou intravenosa. Crianças muito jovens e pacientes idosos são os que mais requerem esse tipo de intervenção (ESPGAN, 1997; MÉNDEZ & ARIAS, 2007). A

desidratação ocorre mais em pacientes sujeitos a freqüentes episódios de gastroenterites, crianças desnutridas, casos graves de infecção mista, imunodeficiência ou diarreia protraída (KURTZ & LEE, 1987; CRUZ et al., 1992).

O papel da administração da imunoglobulina intravenosa no tratamento de pacientes imunocomprometidos que não responderam de maneira adequada às medidas terapêuticas convencionais, ainda não foi totalmente elucidado, necessitando de estudos adicionais para determinar a eficácia e estabelecer recomendações apropriadas (BJÖRKHOLM et al., 1995).

A utilização de gamaglobulina humana hiperimune com altos títulos de IgG anti HAstV-1 em crianças submetidas a transplante de medula óssea infectadas por este sorotipo de vírus, não impediu a replicação viral (CUBITT et al., 1999).

Uma diminuição na replicação dos HAstV pode ser observada na presença de flavanóides (Superti et al. (1990).

1.11 CONTROLE E PREVENÇÃO

A interrupção da transmissão viral representa medida extremamente importante, especialmente em hospitais, creches, asilos e ambientes familiares, onde a contaminação pessoa-a-pessoa acontece com freqüência. Deste modo, procedimentos adequados de higiene pessoal, principalmente a lavagem das mãos antes e após o contato com o paciente e limpeza de todas as superfícies com desinfetantes adequados devem ser reforçados nestes locais, devido à resistência dos HAstVs aos vários agentes físicos e químicos, uma vez que os HAstVs mantem sua infectividade após o uso de desinfetantes de rotina e água clorada (KURTZ et al., 1980; BENNET et al., 1995; ABAD t al., 1997; WILHELMI et al., 2003; MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

O isolamento de crianças hospitalizadas com quadro diarréico grave, assim como dos pacientes imunocomprometidos, representa uma medida crucial para prevenir as infecções nosocomiais, principalmente se considerado o longo período de excreção viral mesmo após a resolução dos sintomas (MITCHELL, 2002; WALTER & MITCHELL, 2003).

Crianças mantidas em creche, com diarreia profusa devem ser afastadas até a resolução do quadro (MICHELL, 2002).

As medidas que visam a prevenir e controlar surtos de gastroenterite viral causados pelos HAstVs devem ser dirigidas principalmente à eliminação das fontes comuns de infecção por meio de ações como: o monitoramento dos indivíduos responsáveis pela manipulação de alimentos que estejam ou estiveram recentemente com diarreia por alguns dias; o controle dos suprimentos de água usados tanto para o consumo humano como de piscinas e a interrupção da transmissão pessoa-a-pessoa: pelo isolamento dos doentes, principalmente na fase aguda (WALKER & MITCHELL, 2003; SANTOS & CARDOSO, 2005).

Como esses vírus causam infecção em faixas etárias similares àquelas em que incidem os rotavírus, no futuro será possível considerar a formulação de uma única vacina que proteja as crianças contra ambos os vírus, para eventual administração nos primeiros meses de vida. Tal prática induziria uma imunidade precoce, uma vez que esses vírus infectam principalmente crianças menores de um ano de idade (MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

Porém, certos fatores devem ser considerados antes de cogitar-se o desenvolvimento de uma vacina, tais como um melhor entendimento da imunidade nas infecções por esses vírus, bem como o papel protetor dos anticorpos homotípicos e heterotípicos e a realização de estudos clínico-epidemiológicos mais abrangentes, utilizando métodos de diagnóstico que detectem os vírus tanto em amostras humanas como nas ambientais (WALTER & MITCHELL, 2003).

2 RELEVÂNCIA

Há mais de 20 anos, o Instituto Evandro Chagas vem desenvolvendo pesquisas no campo das gastroenterites agudas, envolvendo menores de 5 anos, com o intuito de determinar a importância dos vírus, principalmente dos RV nesses episódios. Vários estudos já foram realizados tanto em âmbito hospitalar como na comunidade, os quais demonstraram ser os RV os principais agentes responsáveis por esses quadros clínicos. Porém, cerca de 20% dos casos ainda permanecem sem uma definição etiológica, logo, pretende-se realizar estudos envolvendo os HAstVs, já descritos como causa importante de diarreia.

A melhoria dos programas de vigilância e a aplicação de métodos sensíveis, como os EIA (HERMANN et al., 1991; LEW et al., 1991) e as técnicas moleculares desenvolvidas (NOEL et al., 1995; SAKAMOTO et al., 2000; SCHNAGL et al., 2002), aprimoraram o diagnóstico das gastroenterites não-bacterianas. Com isso, consolidou-se a importância que os HAstVs assumem, juntamente com os RV e os calicivírus humanos (CV) – Norovírus (NV) e Sapovirus (SV)– como causa de gastroenterite aguda, nos âmbitos ambulatorial e hospitalar (JAKAB et al., 2004).

A pesquisa dos HAstVs no Brasil era inicialmente restrita aos centros que possuíam ME e a confirmação dos casos estudados variou de 0,8% a 4,2% (LINHARES et al., 1990; LEITE et al., 1991; TIMENETSKY et al., 1993). Porém, a introdução do EIA e de técnicas moleculares, representou um avanço no diagnóstico e cerca de 2,8% a 33% de casos estudados em diversas oportunidades puderam ser confirmados (SILVA, 1998; SILVA et al., 2001; CARDOSO et al., 2002; MIRANDA, 2004; VICTORIA et al., 2007).

Os dados ora disponíveis se originam principalmente das regiões sudeste e centro-oeste do Brasil. Em relação às regiões norte e nordeste, as informações existentes referem-se a estudos realizados em Belém, PA e Recife, PE, utilizando-se a ME, com percentuais de positividade de cerca de 3% (LINHARES et al., 1990; GABBAY et al., 1994). Em Belém também foi realizado um estudo soropidemiológico envolvendo 37 crianças, sendo que aos 36 meses de idade 50,2% já possuíam anticorpos anti-HAstV (MENDES, 1997).

Com a utilização de novas metodologias, esta investigação objetiva fornecer maiores informações sobre a circulação desses vírus em Belém, PA – âmbitos hospitalar, ambulatorial e comunitário – e São Luís, MA – hospitalar. Dados referentes a um surto ocorrido na tribo indígena Maxakali, Minas Gerais, causado por HAstV do tipo 2 (HAstV-2), fazem também parte deste estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Detectar e genotipar os HAstV em amostras fecais de crianças menores de 5 anos residentes em Belém-Pará e em outras localidades, integrantes de diversos estudos realizados no Instituto Evandro Chagas, no período de 1982 a 2004.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Detectar pelo EIA a freqüência dos HAstVs em quadros de diarréia entre crianças pertencentes a diferentes estudos realizados ao longo de 22 anos;
- b) Identificar pela RT-PCR ou pelo seqüenciamento genômico os genotipos de HAstV circulantes;
- c) Realizar a comparação de amostras obtidas em diferentes períodos, que apresentaram o mesmo genotipo, com outras disponíveis no banco genético (GENBANK);
- d) Analisar a presença de prováveis co-infecções de RV e HAstV.

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho visou à detecção e genotipagem de HAstV em diversos estudos realizados em Belém, PA, no período de 1982 a 2000. Ao longo deste período tivemos ainda a oportunidade de investigar a ocorrência de HAstV provenientes de amostras fecais coletadas em São Luís, MA. O objetivo foi obter informações sobre a circulação desses vírus na região Amazônica Oriental, principalmente no que tange aos aspectos epidemiológicos e moleculares. Tais achados corroboraram os já existentes em outras regiões do país, que demonstraram a importância dos HAstVs na gênese da diarreia infantil, destacando-se o HAstV-1 como principal genotipo e a circulação dos demais genotipos (SILVA et al., 2001; CARDOSO et al. 2002; SILVA et al., 2006; SANTOS et al., 2007; VICTORIA et al., 2007). Como resultado da vigilância desses vírus, foi estudado ainda o primeiro surto de gastroenterite causado pelo HAstV-2 em indígenas da reserva Maxakali, Minas Gerais.

Os espécimes fecais utilizados na detecção dos HAstVs foram coletados ao longo de 22 anos, provenientes de pesquisas realizadas no Instituto Evandro Chagas (IEC) da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS), visando à determinação da prevalência dos rotavírus nos âmbitos hospitalar, ambulatorial e comunitário. Esse período possibilitou a observação de situações epidemiológicas distintas. Assim como os demais estudos, a presente investigação também obteve a aprovação do Comitê de Ética em pesquisa do IEC (ANEXO 1).

No apêndice A “Prevalência de genotipos de astrovírus humanos associados com gastroenterite entre crianças de Belém, Brasil” foram estudadas 540 crianças habitantes na periferia de Belém, PA, no período de abril de 1990 a agosto de 1992. Estas crianças receberam uma vacina tetravalente para rotavírus, de origem símio-humana, geneticamente reestruturada (RRV-TV), e foram acompanhadas nos dois primeiros anos de vida (LINHARES et al., 1996). Nesse período, 3.075 espécimes fecais foram coletados durante os episódios de gastroenterite e 20% das fezes obtidas em cada mês, reunidas aleatoriamente, foram testadas quanto à presença de HAstV. Esses vírus foram detectados em 5,4% (34/624) dos casos pelas técnicas de EIA e/ou RT-PCR sendo esse percentual menor do que o registrado na Finlândia (9%) em estudo similar ao de Belém (PANG & VESIKARI, 1999).

A genotipagem dos HAstVs baseada na ORF2 do genoma demonstrou uma correlação de 69,2% entre as técnicas de nested-PCR e seqüenciamento. Essa relação foi de 100% para os HAstVs genótipos 1, 2 e 6, porém o mesmo não se aplicou aos genótipos 3, 4 e 7, possivelmente devido a reações cruzadas (MATSUI et al., 1998). Em um estudo conduzido em uma comunidade periurbana da Cidade do México (WALTER et al., 2001) e na Hungria (JAKAB et al., 2004), uma correlação de 84% e 90%, respectivamente, foi observada. Sete amostras negativas por nested-PCR foram genotipadas apenas pelo seqüenciamento.

Durante o período estudado, cinco genótipos de HAstV circularam em Belém-PA, sendo o HAstV-1 o mais prevalente (45,5%), seguido do HAstV-2 (27,3%) corroborando com estudos prévios realizados em diferentes países, incluindo o Brasil (CARDOSO et al., 2002; DALTON et al., 2002; GUIX et al., 2002; ESPUL et al., 2004; VICTORIA et al., 2007).

Todas as amostras de HAstV-1 foram classificadas na linhagem 1a, conforme descrito anteriormente (MEDINA et al., 2000; GUIX et al. 2002). Essa linhagem foi também detectada em Bogotá, Barcelona, Brasília e Goiânia (MEDINA et al., 2000; GUIX et al. 2002; SILVA et al., 2006). Os HAstV-2 e HAstV-4 foram classificados como pertencentes às linhagens 2b e 4b, respectivamente, sendo o primeiro genótipo agrupado com amostras de Bogotá e Brasília e o segundo associado às de Caracas, Brasília e Rio de Janeiro (MEDINA et al., 2000; SILVA et al., 2006; VICTORIA et al., 2007).

Os HAstVs-1 predominaram durante o primeiro ano de estudo (maio de 1990 a maio de 1991), distinto do observado em Barcelona, onde este genótipo demonstrou uma frequência crescente ao longo dos três anos de investigação (GUIX et al., 2002). A detecção dos HAstV-2 ocorreu entre os meses de julho a novembro de 1991, diferindo do padrão observado em uma comunidade periurbana da Cidade do México, onde os HAstV-2 ocorreram ao longo de 18 meses de pesquisa (WALTER & MITCHELL, 2000). A circulação dos HAstV-4 foi observada entre os meses de setembro a novembro de 1990.

As faixas etárias mais acometidas foram as de >3 a 6 meses (9%) e de >12 a 18 meses (7,4%), sendo similares a resultado observados em um estudo realizado em Córdoba, Argentina (GIORDANO et al., 2004). No entanto, esses dados diferem dos registrados em Barcelona, Espanha, onde as crianças de 2 a 4

anos de idade foram as mais acometidas (GUIX et al., 2002). Pesquisa conduzida em Goiânia, GO (CARDOSO et al., 2002), mostrou que a percentagem geral obtida em crianças menores de dois anos foi baixa (2,8%) quando comparada ao do estudo de Belém.

Os HAstV-4 foram encontrados principalmente em crianças entre >3 a 6 meses, HAstV-2, dos >12 a 18 meses e HAstV-3, dos >18 a 24 meses. Os HAstV-1 infectaram crianças de todas as faixas etárias estudadas, com exceção das maiores de 18 meses.

A infecção por HAstV em Belém foi em geral associada a diarreia e vômitos (32%) e, menos freqüentemente, a febre e desidratação (9%, cada). Esses achados foram similares aos observados em outros estudos na comunidade realizados em diversas regiões do mundo (GUERRERO et al., 1998; MALDONADO et al., 1998).

Casos de co-infecção envolvendo os HAstVs e outros patógenos, tais como rotavírus, bactérias e parasitas, não foram detectados em Belém, diferente do descrito em outras localidades (PANG & VESIKARI, 1999; GUIX et al., 2002; MÉNDEZ-TOSS et al., 2004).

A utilização da vacina RRV-TV em Belém, não interferiu na incidência de gastroenterite por HAstVs, dado similar àqueles de um estudo realizado na Finlândia (PANG & E VESIKARI, 1999). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi verificada nas taxas de positividade para os HAstVs em grupos de vacinados e placebo: 4,8% e 6,0%, respectivamente.

A maior prevalência dos HAstV ocorreu em janeiro e outubro de 1991, com taxas de 15 e 17% respectivamente. A temperatura e a umidade registradas nesses dois meses não diferenciaram significativamente, porém, um maior índice pluviométrico foi observado em janeiro – 392 mm³ – em relação a outubro – 157 mm³. Em um estudo realizado na região centro-oeste do Brasil, os HAstVs foram detectados no período de outubro a dezembro de 1998, que corresponde à primavera e ao início do verão naquela região (CARDOSO et al., 2002).

Os resultados obtidos neste estudo, demonstram a importância da circulação dos HAstVs em Belém, PA e seu potencial como enteropatógeno viral nos casos de gastroenterite infantil. Além disso, as metodologias utilizadas apresentaram

os HAstV-1 como os mais prevalentes, e também a detecção dos genótipos HAstV-2, HAstV-3, HAstV-4 e HAstV-6.

No estudo “Prevalência e diversidade genética de astrovírus em crianças com e sem diarreia em São Luís, Maranhão, Brasil” (APÊNDICE B) espécimes fecais de crianças menores de 2 anos internadas ou atendidas no ambulatório pediátrico do Hospital Universitário Materno-Infantil da Universidade Federal do Maranhão (HUMI/UFMA), São Luís, foram analisadas para a detecção de HAstV. Apesar do objetivo inicial da coleta desses espécimes ter sido a detecção dos rotavírus (LUZ et al., 2005), considerou-se que a pesquisa dos HAstVs, seria de particular relevância em termos epidemiológicos e moleculares, devido à inexistência de dados sobre a presença desses vírus nessa região do Brasil.

Um total de 183 espécimes fecais foi testado, sendo 84 provenientes de crianças que apresentavam diarreia e 99 com outra sintomatologia. Os HAstVs foram detectados em 8% das amostras (11%, no grupo diarreico, 5%, no não diarreico) pelas técnicas de EIA e/ou RT-PCR. A prevalência de 11% encontrada no grupo diarreico foi similar à observada em Madri, Espanha (DALTON et al., 2002); no entanto, menor que os 16% descritos em crianças chilenas (GAGGERO et al., 1998). O maior percentual obtido em São Luís pode ser explicado pela população analisada (hospital) quando comparada com aquela de Belém, PA (comunidade), onde uma menor prevalência foi observada (5,4%).

A prevalência de HAstV encontrada no grupo não diarreico (5%), foi similar às relatadas em vários países como México (3%), Bangladesh (2%), África do Sul (2%), Guatemala (2%) e Tailândia (2%) (HERRMANN et al., 1991; CRUZ et al., 1992; STEELE et al., 1998; UNICOMB et al., 1998; MÉNDEZ-TOSS et al., 2004).

As diferenças observadas nas taxas de detecção entre EIA e RT-PCR podem ser explicadas pela natureza de detecção das mesmas. Fatores como diferenças na seqüência nucleotídica da região de hibridização e do iniciador e presença de inibidores nas reações de RT-PCR, poderiam explicar estes resultados divergentes os quais foram previamente observados por Maldonado et al. (1998) e Silva et al. (2001).

Quatro amostras positivas só por EIA também foram testadas por ME e partículas virais com morfologia típica de HAstV foram visualizadas em duas delas. Provavelmente, a presença de partículas virais defectivas em concentrações

inferiores às requeridas pela ME podem ter sido responsáveis pelo resultado negativo dos outros dois espécimes (SILVA et al., 2001).

Amostras positivas pela RT-PCR foram seqüenciadas, sendo cinco (55,6%) classificadas como HAstV-1 e as demais como HAstV-2, HAstV-3, HAstV-4 e HAstV-5. Esta maior prevalência do HAstV-1 foi demonstrada anteriormente em estudos realizados em Belém e em outras localidades (MUSTAFA et al., 2000; SILVA et al., 2001, CARDOSO et al., 2002; DALTON et al., 2002; GUIX et al., 2002; ESPUL et al., 2004; GABBAY et al., 2007b).

A co-circulação de cinco genótipos distintos de HAstV durante os dois anos de estudo sugere que a distribuição dos mesmos em São Luís variou ao longo do tempo. Padrão similar foi observado em Belém (GABBAY et al., 2007b), com exceção dos genótipos HAstV-5 e HAstV-6 que foram somente observados em São Luís e Belém, respectivamente.

A maior taxa de infecção pelos HAstV entre crianças diarréicas ocorreu na faixa etária de 0-6 meses (18%). Esses resultados concordam com os obtidos em Córdoba, Argentina e em Belém, PA, onde positivities de 24% e 9%, respectivamente, foram registrados em crianças de 4 a 6 meses de idade (GIORDANO et al., 2004; GABBAY et al., 2007b). No grupo dos não-diarréicos, os HAstVs foram detectados com maior freqüência em crianças entre 18 a 24 meses de idade (25%). Contudo, deve-se levar em consideração que essa prevalência possa ter ocorrido ao acaso, devido ao reduzido número de crianças participantes desse grupo.

O percentual de vômitos (89%), febre (89%) e desidratação moderada (56%), foram maiores em São Luís do que os registrados em uma unidade de emergência em Madri, Espanha (65%, 39% e 24%, respectivamente) (DALTON et al., 2002) e em Belém, PA (32%, 9%, 9% respectivamente) (GABBAY et al., 2007b). As diferenças observadas em São Luís e Belém são provavelmente devido às populações estudadas (comunidade e hospital).

Em São Luís, co-infecções envolvendo HAstV, rotavírus e adenovírus entérico foram detectadas em 36% dos espécimes positivos, taxa maior do que os 17% observados em Barcelona, Espanha, e Providencia, USA (DENNEHY et al., 2001; GUIX et al., 2002), porém menor que os 44% registrados no Rio de Janeiro (VICTORIA et al., 2007). Em um estudo com crianças mexicanas, HAstV foi

encontrado em freqüências similares entre o grupo de crianças diarréicas positivas e negativas para rotavírus, sugerindo que nenhuma sinergia ocorre entre infecções causadas por esses dois vírus (MÉNDEZ-TOSS et al., 2004). Ao contrário dessas pesquisas, na de Belém (GABBAY et al., 2007b) nenhum caso de infecção mista foi verificado.

A maioria das infecções por HAstV neste estudo ocorreu em dois períodos distintos: setembro a dezembro de 1997 e março a julho de 1999. O primeiro período corresponde a uma estação relativamente seca, com variações de temperatura de 27,5^oC a 28^oC, e o segundo a uma típica estação chuvosa, com precipitações intensas – 200 a 600 mm³ – e uma temperatura em torno de 27^oC. Ressalte-se que todas as amostras de HAstV-1 foram obtidas durante o segundo período, apresentando similaridade com os resultados obtidos em Belém, onde esse genótipo foi mais frequentemente detectado nas mesmas condições de pluviosidade (GABBAY et al., 2007b).

Com o objetivo de se obter uma avaliação mais representativa da epidemiologia dos HAstV na região nordeste do Brasil, sugere-se a realização de novos estudos de vigilância envolvendo um maior número de casos diarréicos e não diarréicos.

A importância que os HAstV-1 assumem como principal genótipo encontrado na maioria dos estudos realizados nos diversos países do mundo, assim como naqueles conduzidos em Belém, PA, e São Luís, MA, suscitou o interesse em realizar pesquisas mais abrangentes. No artigo “Epidemiologia molecular de astrovírus tipo 1 em Belém, Brasil, como um agente de gastroenterite infantil, por um período de 18 anos (1982-2000): identificação de duas possíveis novas linhagens” foram apresentadas a diversidade antigênica e a variabilidade intratípica das amostras de HAstV-1 detectadas ao longo de 18 anos de investigações conduzidas no IEC, SVS (APÊNDICE C).

Neste estudo os espécimes fecais obtidos de crianças diarréicas que participaram das duas pesquisas anteriormente (Belém e São Luís) e de outras desenvolvidas no IEC de 1982 a 2000 foram testados quanto à presença dos HAstV utilizando-se a técnica de EIA. Em todas as amostras positivas (123/2.534, 4,8%) e naquelas que apresentaram valores de densidade óptica de pelo menos duas vezes à do controle negativo foi realizada a RT-PCR. Considerando-se ambas as

metodologias 6,1% (155/2534) dos casos foram confirmados (GABBAY et al., 2007a) similar àquela relatada na Cidade do México (6,8%) (WALTER et al., 2001). No entanto, revela-se maior que a de 1,6% descrita por Jacob et al. (2004) em um hospital na Hungria e menor que os índices de 12,4% e 14% registrados em Córdoba e Rio de Janeiro, respectivamente (GIORDANO et al., 2004; VICTORIA et al., 2007). Ressalte-se que este estudo foi realizado em diferentes populações: comunidade, unidade de saúde, creches e hospitais, sendo este fator a provável causa da variação entre as taxas de positividade observadas: comunidade (2,7% e 5,4%); posto de saúde (5,5%) e hospitalar (6,3% a 9,9%).

Estudos conduzidos em uma comunidade na periferia da Cidade do México e durante investigação na Finlândia com a vacina RRV-TV, demonstraram prevalências para HAstV de 6,8% e 9%, respectivamente, superiores às registradas nas pesquisas na comunidade em Belém (PANG AND VESIKARI, 1999; WALTER et al., 2001, GABBAY et al., 2007b). Um alto percentual (17%) foi observado em um estudo envolvendo crianças Maias residentes em área rural do México (MALDONADO et al., 1998).

Dos dez surtos estudados durante os dois anos de vigilância realizado em duas creches de Belém (crianças de 0-4 anos), os HAstV foram agentes etiológicos responsáveis por quatro deles, sendo os únicos patógenos detectados em dois destes surtos. Os HAstVs também já foram associados a surtos ocorridos em creches nas cidades de Norfolk, Virginia e do Rio de Janeiro, RJ apresentando as mesmas características epidemiológicas (MITCHELL et al., 1999; SILVA et al., 2001).

As pesquisas envolvendo os HAstVs em população ambulatorial ainda são muito restritas porém, um estudo realizado por Espul et al. (2004) com crianças argentinas, demonstrou a detecção dos vírus em 3,5% dos espécimes. Estudo realizado em Belém, no mesmo tipo de população, mostrou que 5,5% dos casos suspeitos foram confirmados.

Diversas investigações têm demonstrado a importância dos HAstVs como causa de hospitalizações durante a infância (GUIX et al., 2002; ESPUL et al., 2004; JAKAB et al., 2004). Internações hospitalares em Belém (6,3% a 9,9%) foram maiores que as descritas em outras localidades (MUSTAFA et al., 2000; GIORDANO et al., 2001; GUIX et al., 2002; SCHNAGL et al., 2002; MÉNDEZ-TOSS et al., 2004),

similares as observadas no Quênia e na Tunísia (FODHA et al., 2006; KIULIA et al., 2007), porém menores do que as detectadas entre crianças diarréicas espanholas e chilenas (GAGGERO et al., 1998; DALTON et al., 2002).

Estudos de prevalência dos HAstVs no Brasil, têm sido conduzidos em hospitais públicos e demonstraram taxas que variaram de 3% a 6,8% (LEITE et al., 1991; STEWIEN et al., 1991; TIMENETSKY et al., 1993; CARDOSO et al., 2002; MIRANDA, 2004; SANTOS et al., 2007). Valores inferiores ou similares foram observados em Belém (6,3% a 9,9%). Recentemente estudos em três hospitais públicos do Rio de Janeiro demonstraram uma prevalência de 13,5% (VICTORIA et al., 2007) enquanto que na mesma população em São Luís, MA, foi de 11% (GABBAY et al., 2005).

O HAstV-1 foi o genotipo predominante (60,7%) durante esses 18 anos de estudo em Belém, com exceção do observado em estudo na comunidade em que o HAstV-2 apresentou a maior prevalência (58,3%). Esses resultados corroboram com estudos prévios realizados mundialmente (PALOMBO et al., 1996; GAGGERO et al., 1998; MUSTAFA et al., 2000; SILVA et al., 2001; CARDOSO et al., 2002; DALTON et al., 2002; GUIX et al., 2002; ESPUL et al., 2004; VICTORIA et al., 2007). Foi observada a circulação de outros genotipos de HAstV em Belém durante esse período. A importância do HAstV-2 foi demonstrada em estudos realizados em uma comunidade periurbana da Cidade do México onde este genotipo foi mais prevalente e em um hospital de Madri, onde o HAstV-2 foi o segundo genotipo mais detectado com valores de 23,1% (WALTER et al., 2001; DALTON et al., 2002).

Para se determinar a variabilidade molecular existente entre os HAstV-1 detectados nesses estudos, todos os 140 espécimes positivos pela RT-PCR foram seqüenciados, utilizando-se uma região do capsídeo. A análise nucleotídica dessas seqüências classificou 85 delas como HAstV-1 e as demais 55 como outros genótipos – HAstV-2 a HAstV-8. Em quatro amostras do HAstV-1 não foi possível definir seqüências confiáveis para a análise filogenética.

Das 81 amostras HAstV-1 analisadas durante dez anos, 76 (93,8%) se agruparam na linhagem 1a, a qual foi subdividida em três grupos (FIGURA 2, APÊNDICE C). As outras cinco amostras foram propostas como novas linhagens (1e e 1f), considerando-se a variação na seqüência de = 7% na análise da região da ORF2, previamente descrita por Guix et al. (2002) e Medina et al. (2000). Altos

valores (100%) de *bootstrap* sustentam esses novos achados. Três amostras se agruparam na linhagem 1e e duas na 1f, caracterizando achados pioneiros e que sustentam a variabilidade intratípica ao longo do tempo.

A observação de que uma única linhagem circulou durante todo esse período contrasta com resultados previamente descritos por Medina et al. (2000) que observaram a co-circulação de duas linhagens (HAstV-1a e 1b) em um curto período (1997-1999). Outro estudo demonstrou a circulação de três linhagens simultaneamente (HAstV-1a, 1b, e 1d) em um período de três anos (1997-2000) (GUIX et al. 2002).

Investigação realizada na Austrália Central, durante 18 anos (1981-1998), demonstrou que o HAstV-1a foi o único genótipo detectado por 14 anos consecutivos (1982-1995), tempo superior aos dez anos observados em Belém. A linhagem HAstV-1b também circulou naquele país nos anos 1996 a 1998 (SCHNAGL et al., 2002). Pesquisas realizadas nas regiões centro-oeste e sudeste do Brasil, registraram a circulação da linhagem HAstV-1d nos anos de 2003 a 2005 (SILVA et al., 2006; VICTORIA et al., 2007).

Foi demonstrado que as amostras classificadas como possíveis novas linhagens 1e e 1f circularam concomitantemente. Divergências de pelo menos 7% foram observadas quando se comparou as linhagens a - f entre si, com exceção da linhagem 1e com 1d, que apresentou uma divergência de 5%.

Variações na seqüência genômica foram observadas entre as amostras de HAstV-1 de Belém; porém, o fato de somente cinco alterações de nt resultarem em mudança de aa ao longo desses 18 anos, sugeriu uma estabilidade genética significativa entre essas amostras. Esses resultados são comparáveis àqueles obtidos nos estudos realizados em Melbourne e Austrália Central, onde a análise da mesma região da ORF2 (348 nt) indicou somente uma ou nenhuma mudança de aa (PALOMBO & BISHOP, 1996; MUSTAFA et al., 2000; SCHNAGL et al., 2002).

Tal estabilidade pode estar relacionada à análise da região selecionada (ORF2), que é relativamente conservada. Porém, uma diversidade genética com mudanças de aa foi registrada em amostras de HAstV-1b e 1c provenientes da Colômbia e Venezuela (MEDINA et al., 2000).

A circulação única da linhagem HAstV-1a por um período de dez anos consecutivos constitui um dado epidemiológico relevante, considerando-se por

exemplo o desenvolvimento de uma futura vacina para esses vírus. Estudos adicionais utilizando espécimes fecais coletados mais recentemente se fazem necessários, para avaliar se os HAstV-1d também circularam na região norte, como ocorreu em outras regiões do Brasil (SILVA et al., 2006; VICTORIA et al., 2007).

Dos oito genótipos de HAstV já descritos, os caracterizados como 6, 7 e 8 são os mais raramente detectados (MUSTAFÁ et al., 2000; GUIX et al., 2002; MÉNDEZ-TOSS et al., 2004). No caso dos HAstV-8, após a descrição do protótipo no Reino Unido, em 1995 os demais achados inicialmente se restringiam a um único isolamento, como os ocorridos em Gaza, Uganda, Paquistão e Austrália (MONCEYRON et al., 1997; MUSTAFA et al., 2000; SAKAMOTO et al., 2000) e posteriormente no Brasil e Estados Unidos (SILVA et al., 2006). Um aumento no percentual de detecção dos HAstV-8 tem sido observado em pesquisas mais recentes, possivelmente devido ao aprimoramento das metodologias empregadas (GLASS et al., 1996). Estudos realizados no Egito, Espanha, Coreia, África do Sul, Hungria, México e Brasil, demonstraram a presença desses vírus em taxas que variaram de 8% a 23% do total de HAstV detectados (NAFICY et al. 2000; GUIX et al. 2002; KANG et al. 2002; NADAN et al. 2003; JAKAB et al. 2004; MÉNDEZ-TOSS et al. 2004; VICTORIA et al., 2007).

No artigo “Primeira detecção de astrovírus genótipo 8 em uma criança com diarreia em Belém, Brasil: comparação com outras amostras mundiais e identificação de possíveis três linhagens” (APÊNDICE D), uma amostra de HAstV-8 (PA-NSC087-BR) foi detectada pela primeira vez em Belém durante um estudo realizado em um hospital público, no período de novembro de 1992 a novembro de 1994, envolvendo crianças menores de 5 anos, admitidas com quadro de gastroenterite aguda (GUSMÃO et al. 1999).

O HAstV-8 isolado a partir do espécime fecal de uma criança do sexo feminino, de 7 meses, que apresentava diarreia aguda com quatro dias de duração, prolongada por 12 dias. Registrou-se desidratação moderada durante as primeiras 48 horas de hospitalização. Febre foi diagnosticada no primeiro dia e infecção respiratória aguda no segundo e terceiro dias após a admissão. A possibilidade de infecção nosocomial não pode ser descartada, uma vez que a amostra fecal só foi obtida quatro dias após a internação. Existe, porém, uma forte evidência de infecção adquirida na comunidade, visto que só se verificou um único isolamento de HAstV-8

no âmbito hospitalar. Durante esse estudo 9,9% (37/372) dos casos estudados foram confirmados, com a detecção de três infecções nosocomiais pelo HAstV-1.

A análise antigênica e molecular da amostra PA-NSC087-BR visou caracterizar essa amostra e compará-la com outros HAstV-8 identificados em diferentes localidades, considerando os poucos estudos disponíveis (MÉNDEZ-TOSS et al., 2000; TAYLOR et al., 2001). Esta constitui a primeira análise entre esses vírus baseada na região da ORF1a e na extremidade 5' da ORF2.

A análise da região ORF1a demonstrou que a amostra PA-NSC087-BR se agrupou com outros espécimes de HAstV-8, e com os HAstV-1 a HAstV-5, dentro do genogrupo A, como descrito anteriormente por Belliot et al. (1997) e Taylor et al. (1997). Uma similaridade de 93-94% (nt) e de 96-99% (aa) foi observada entre amostras deste genotipo, com exceção da amostra Yuc-8 (México), que apresentou similaridades de 97% e 100% para os nt e aa, respectivamente. Com os demais genotipos (1 a 5) a homologia foi de 90-93% para nt e 96-97% para aa. Similaridades inferiores foram verificadas entre esses e os HAstV-6 e HAstV-7 (80% e 92-95% para nt e aa, respectivamente).

Na investigação realizada em Belém não se observou uma grande similaridade entre as amostras de HAstV-8 e HAstV-4, como descrito anteriormente (BELLIOT et al., 1997; Taylor et al., 1997).

A análise da região ORF2 indicou que a amostra PA-NSC087-BR apresentou uma alta similaridade com a proveniente do Paquistão (99% nt). Uma divergência de 6% na seqüência de nt foi verificada em relação ao protótipo do HAstV-8, e 7% com a amostra proveniente do Rio de Janeiro.

Considerando-se uma divergência de pelo menos 7% (MEDINA et al., 2000; GUIX et al., 2002), o HAstV-8 foi classificado em três linhagens distintas.

A similaridade em nível de aa baseada na análise da região ORF2 foi de 100%, quando se comparou a amostra PA-NSC087-BR com as demais HAstV-8, com exceção das detectadas em Melbourne, Austrália (Melb8A-97%), Rio de Janeiro, Brasil (RJ8163-91%) e com o protótipo (HAstV-8-91%). Esses dados demonstraram a grande diferença existente entre o protótipo e as demais amostras do genotipo 8 que circulam mundialmente, fato que sustenta a sua classificação em três linhagens

Uma estreita relação deste vírus com o HAstV-4 foi observada, diferente do verificado com os demais genótipos, corroborando com dados obtidos por Taylor et al. (2001) em amostra proveniente da África do Sul, e por Mendéz-Toss et al. (2000) nas análises realizadas no México.

A análise da ORF1a desta amostra demonstrou padrão similar ao daquela do México.

A correlação demonstrada (97% a 99%) entre a amostra detectada em Belém, Goiânia, Rio de Janeiro e aquelas de outros países como Paquistão, México, África do Sul, Espanha, sugere que a circulação de HAstV-8 é geneticamente similar nesses diferentes países.

A amostra PA-NSC087-BR também foi testada quanto à presença dos rotavírus, calicivírus, bactérias e parasitas, com a detecção exclusiva dos HAstV-8 sustentando a hipótese da etiologia para esse genotipo neste processo gastrointestinal.

Este estudo não apenas detectou o primeiro caso de HAstV-8 em Belém, Brasil, assim como comparou este pela primeira vez, com amostras provenientes de outros países. A análise base nas seqüências da região ORF2, evidenciou a existência de três linhagens distintas dentro do HAstV-8.

Durante o desenvolvimento deste trabalho tivemos a oportunidade de estudar um extenso surto de gastroenterite aguda que ocorreu no ano de 2004 em indígenas da Reserva Maxakali, localizada no Vale do Mucuri, nordeste de Minas Gerais, Brasil (APÊNDICE E – “Caracterização de amostras de astrovírus genotipo 2 causando um extenso surto de gastroenterite entre índios Maxakali, sudeste do Brasil”).

Um contato diário entre os índios e a comunidade urbana foi observado, ocorrendo por uma estrada que cruza as terras indígenas os diferentes distritos e fazendas da região. Os índios se deslocam diariamente para as cidades utilizando uma linha regular de ônibus ou mesmo a pé. O tratamento de saúde era uma das principais razões aventadas para o deslocamento de grupos familiares inteiros, aproveitando os meios de transporte oferecidos pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA).

Durante o surto havia 1.220 habitantes nas duas aldeias: 720 residindo na área da aldeia “Água Boa” e 500 na aldeia “Pradinho”. “Água Boa” ocupa uma área de 2.412 hectares, constituída de um conglomerado de sete pequenas aldeias, “Pradinho”, por sua vez, possui área de 1.864 hectares, formada por oito pequenas aldeias. O surto de gastroenterite acometeu um total de 117 índios dessa reserva, envolvendo tanto a aldeia “Água Boa” como a “Pradinho”, afetando principalmente crianças na faixa etária de 0-6 anos de idade

Das 46 amostras enviadas para o IEC, Belém, Pará, 26 (56%) foram positivas para HAstV, 4% para adenovírus não-entérico e todas mostraram-se negativas quanto à presença dos RV. A caracterização molecular demonstrou ser o HAstV-2 o responsável pelo surto. O emprego de metodologias mais específicas, como o EIA e RT-PCR, aumentou o potencial de detecção desses vírus (GABBAY et al. 2006).

Divergência entre 15,9% e 7,7% foram observadas quando estes vírus foram comparados com amostras australianas (MUSTAFÁ et al., 2000) e colombianas (MEDINA et al., 2000) respectivamente. Comparando-se estes agentes com o protótipo e amostras de Belém e São Luís (GABBAY et al., 2005, 2007a e 2007b), foram demonstradas divergências superiores a 7%, sugerindo a existência de uma linhagem distinta dentro do genotipo 2 (HAstV-2c).

A prevalência das gastroenterites por HAstV entre os índios Maxakali, determinada pelo EIA, foi de 24%, com um aumento para 56% quando se utilizou o RT-PCR, indicando que esta metodologia foi mais sensível que o EIA. Está maior sensibilidade da RT-PCR em relação ao EIA já foi descrita previamente (MITCHELL et al., 1995; WALTER et al., 2001; GABBAY et al., 2007b).

As manifestações clínicas dos casos de gastroenterite foram similares em ambas as aldeias “Água Branca” e “Pradinho”. A maioria das crianças apresentou diarreia aquosa profusa, febre e vômitos, sendo que em alguns casos foi observada a presença de infecção das vias aéreas superiores. Desnutrição grave foi diagnosticada em várias crianças, o que pode justificar a exacerbação dos sintomas. Três óbitos ocorreram durante o surto, estando associados com desnutrição e prováveis infecções secundárias bacterianas. Dados epidemiológicos limitados nestas situações específicas restringiram as análises quanto a um possível envolvimento dos HAstV-2 como agentes etiológicos primários nestes óbitos. O

permanente contato dos índios com a área urbana e as precárias condições de higiene provavelmente contribuíram para a introdução e disseminação dos HAstV-2. Além disso, chuvas intensas durante o período do surto provocaram maior aglomeração, principalmente das crianças, exacerbando a transmissão pessoa-a-pessoa. A água usada para consumo durante o surto foi examinada pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), quanto à presença de bactérias, sendo considerada imprópria (comunicação da Coordenadoria Estadual de Saúde Indígena).

Esse surto reforça a necessidade do estabelecimento de uma rede de vigilância em âmbito nacional, incluindo as comunidades isoladas como as indígenas quilombolas e outras, para avaliar a importância dos rotavírus e de outros vírus como os HAstVs, calicivírus e adenovírus entéricos nestes processos.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSÕES

- A taxa de detecção dos HAstVs ao longo de 18 anos de estudo (1982-2000) foi de 6,1%, considerando: comunidades (2,7% e 5,4%), unidade de saúde (5,5%), creches (5,7%) e hospitais (6,3% a 9,9%).
- Os HAstVs foram detectados ao longo dos dois anos de investigação realizado com crianças de Belém, PA, que receberam a vacina RRV-TV, com maior prevalência nos meses de janeiro de 1991 (15%) e outubro de 1991 (17%).
- Em São Luís, MA, no âmbito hospitalar, a prevalência ocorreu setembro a novembro de 1997 e março a julho de 1999.
- As faixas etárias mais acometidas por HAstV no estudo com a RRV-TV em Belém, PA, foram as de >3 a 6 meses (9%) e de >12 a 18 meses (7,4%), enquanto que em São Luís, MA, a maior taxa ocorreu também entre crianças de 0-6 meses (18%).
- Todos os oito genótipos de HAstV foram detectados ao longo dos 18 anos de pesquisa, onde o HAstV-1 foi o mais prevalente (60,7%), seguido do HAstV-2 (24,3%).
- Os percentuais de vômitos (89%), febre (89%) e desidratação moderada (56%) nas infecções por HAstV em São Luís, MA, foram maiores do que os registrados em Belém, PA: 32%, 9% e 9%, respectivamente.
- Casos de co-infecção envolvendo HAstV e rotavírus foram detectados em 36% dos espécimes provenientes de São Luís, MA, diferentemente de Belém, PA, durante o estudo com a RRV-TV.
- Das 81 amostras HAstV-1 analisadas, 76 (93,8%) se agruparam na linhagem 1a e cinco delas em novas linhagens propostas 1e (n=3) e 1f (n=2).
- A linhagem 1a foi subdividida em três grupos, com um valor médio de distância dentro dos mesmos de 0,1-1,1%, e entre eles de 2,5-3,8%.
- Durante dez anos consecutivos (1990-2000), observou-se apenas a circulação da linhagem HAstV-1a.
- As linhagens HAstV-1e e 1f foram isoladas nos anos de 1983 e 1984 (n=4) e em 1994 (n=1), demonstrando que ambas circularam concomitantemente.

- Foi detectada pela primeira vez em Belém uma amostra de HAstV-8 e a caracterização molecular demonstraram que este genotipo pode ser dividido em três linhagens distintas.
- Evidenciou-se a primeira detecção no Brasil de um surto de gastroenterite causado pelo HAstV-2, em uma tribo indígena (Maxakali), Minas Gerais.
- A amostra de HAstV-2 detectada durante o surto entre os índios Maxakali difere das duas outras linhagens já existentes pertencentes a este genotipo, constituindo uma nova linhagem denominada HAstV-2c.

5.2 PERSPECTIVAS

Os dados obtidos durante esses 22 anos de pesquisa sustentam a importância dos HAstV nos quadros de gastroenterite aguda, principalmente entre crianças menores de 5 anos, demonstrando a relevância de estudá-los continuamente, sobretudo considerando a recente inclusão no calendário rotineiro de imunizações da vacina contra os rotavírus. As técnicas empregadas apresentaram grande sensibilidade durante a realização deste trabalho, portanto, um de nossos objetivos é implantação principalmente da RT-PCR e do seqüenciamento, na rotina do laboratório. Pretende-se testar amostras provenientes de outros projetos realizados no IEC após o ano de 2000, como, por exemplo, o estudo da vigilância intensiva das gastroenterites graves em menores de 3 anos, desenvolvido em 2003 em toda a rede hospitalar e unidades de saúde da cidade de Belém. Com isso visamos verificar a circulação do HAstV-1d em Belém nesse período, como ocorrido em outras regiões do Brasil. Uma nova pesquisa envolvendo uma comunidade quilombola, em Ananindeua, PA, será iniciada e todos os episódios de diarreia registrados serão testados quanto à presença dos rotavírus, astrovírus, calicivírus e adenovírus entéricos.

Visando futuras pesquisas relacionadas à caracterização da ORF1a e ORF1b, estoques virais de genotipos mais raros (HAstV-8, HAstV-2c, HAstV-1e e 1f), serão obtidos em cultivo de célula CaCo2.

Novas investigações como caracterização molecular dos HAstV-2 detectados durante os 22 anos em Belém, PA e São Luís, MA, assim com as do surto de Minas Gerais; além do estudo evolutivo dos HAstV-1 são objetivos ainda a serem alcançados dentro deste projeto.

REFERÊNCIAS

ABAD, F. X.; PINTÓ, R. M.; VILLENA, C.; GAJARDO, R.; BOSCH A. Astrovirus survival in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3119-3122, Aug. 1997.

ABAD, F. X.; VILLENA, C.; GUIX, S.; CABALLERO, S. PINTÓ RM, BOSCH A. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 3904-3907, Sep. 2001.

APPLETON, H.; HIGGINS, P. G. Viruses and gastroenteritis in infants. **Lancet**, v.1, n. 7919, p. 1297, Jun. 1975.

ASHLEY, C. R.; CAUL, E. O.; PAVER, W. K. Astrovirus-associated gastroenteritis in children. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, n. 10, p. 939- 943, Oct. 1978.

BASS, D. M.; QIU, S. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. **Journal of Virology**, v. 74, n. 4, p. 1810-1814, Feb. 2000.

BASS, D. M.; UPADHYAYULA, U. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. **Journal of Virology**, v. 71, n. 11, p. 8666-8671, Nov. 1997.

BEHLING-KELLY, E.; SCHULTZ-CHERRY, S.; KOCI, M.; KELLEY, L., LARSEN D.; BROWN, C. Localization of astrovirus in experimentally infected turkeys as determined by in situ hybridization. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 5, p. 595-598, Sep. 2002.

BELLIOT. G.; LAVERAN, H.; MONROE, S. S. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. **Archives of Virology**, v. 142, n. 7, p. 1323-1334, 1997a.

BELLIOT, G.; LAVERAN, H.; MONROE, S. S. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 51, n. 2, p. 102-106, Feb. 1997b.

BENNET, R.; HEDLUND, K. O.; EHRNST, A.; ERIKSSON, M. Nosocomial gastroenteritis in two infant wards over 26 months. **Acta Paediatrica**, v. 84, n. 6, p. 667-671, Jun. 1995.

- BERECIARTU, A.; BOK, K.; GÓMEZ, J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. **Journal of Clinical Virology**, v. 25, n. 2, p. 197-203, Aug. 2002.
- BEURET, C. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 115, n. 1, p. 1-8, Jan. 2004.
- BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H.; RUCK, B. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non bacterial gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, n. 7841, p. 1281-1283, Dec. 1973.
- BJÖRKHOLM, M.; CELSING, F.; RUNARSSON, G.; WALDENSTRÖM, J. Successful intravenous immunoglobulin therapy for severe and persistent astrovirus gastroenteritis after fludarabine treatment in a patient with Waldenstrom's macroglobulinemia. **International Journal of Hematology**, v. 62, n. 2, p. 117-120, Aug. 1995.
- BLACK, R. E. Persistent diarrhea in children of developing countries. **Pediatric Infectious Disease**, v. 12, n. 9, p. 751-761, Sep. 1993.
- BRINKER, J. P.; BLACKLOW, N. R.; HERRMANN, J. E. Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines. **Archives of Virology**, v. 145, n. 9, p. 1847-1856, 2000.
- CABALLERO, S.; GUIX, S.; EL-SENOUSY, W. M.; CALICÓ, I.; PNTÓ, R. M.; BOSCH, A. Persistent gastroenteritis in children infected with astrovirus: association with serotype-3 strains. **Journal of Medical Virology**, v. 71, n. 2, p. 245-250, Oct. 2003.
- CAMPOS, R. C. Movimentos indígenas por educação: novos sujeitos socioculturais na história recente do Brasil. In: ANNUAL MEETING OF ANPED, 23., 2000, Caxambu. **Anais...** São Paulo: ANPED, 2000.
- CARDOSO, D. D. P.; FIACCADORI, F. S.; SOUZA, M. B. L. D.; MARTINS, R. M. B.; LEITE, J. P. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiânia, Goiás, Brazil. **Medical Science Monitor**, v. 8, n. 9, p. CR624-628, 2002.

- CARTER, M. J. Genomic organization and expression of astroviruses and caliciviruses. In: BRINTON, M. A.; CALISHER, C. H.; RUECKERT, R. (Ed.). **Positive Strand RNA Viruses**. New York: Springer-Verlag, Archives of Virology, p. 429-439, 1994. Supplement 9.
- CHAPRON, C. D.; BALLESTER, N. A.; MARGOLIN, A. B. The detection of astrovirus in sludge biosolids using an integrated cell culture nested PCR technique. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 1, p.11-15, Jul. 2000.
- CHIKHI-BRACHET, R.; BON, F.; TOUBIANA, L.; POTHIER, P.; NICOLAS, J. C.; FLAHAULT, A.; KOHLI, E. Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France **Clinical Microbiology**, v. 40, n.11, p. 4266-4272, Nov. 2002.
- COOK, N.; MYINT, S. ASTROVIRUSES. **Journal of Medical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 1-2, Jan. 1995.
- COX, G. J.; MATSUI, S. M.; LO, R. S; HINDS, M.; BOWDEN, R. A.; HACKMAN, R. C.; MEYER, W. G.; MORI, M.; TARR, P. I.; OSHIRO, L. S.; LUDERT, J. E.; MEYERS, J. D.; MCDONALD, G. B. Etiology and outcome of diarrhea after bone marrow transplantation: a prospective study. **Gastroenterology**, v. 107, n. 5, p. 1398-1407, Nov. 1994.
- CRUZ, J. R.; BARTLETT, A. V.; HERRMANN, J. E.; CACERES, P.; BLACKLOW, N. R.; CANO, F. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 1140-1144, May. 1992.
- CUBITT, W. D.; MITCHELL, D. K.; CARTER, M. J.; WILLCOCKS, M. M.; HOLZEL, H. Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a pediatric bone marrow transplant unit. **Journal of Medical Virology**, v. 57, n. 3, p. 313-321, Mar. 1999.
- CUNLIFFE, N. A.; DOVE, W.; GONDWE, J. S.; THINDWA, B. D.; GREENSILL, J.; HOLMES, J. L.; BRESEE, J. S.; MONROE, S. S.; GLASS, R. I.; BROADHEAD, R. L.; MOLYNEUX, M. E.; HART, C. A. Detection and characterization of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. **Journal of Medical Virology**, v. 67, n. 4, p. 563-566, Aug. 2002.

- DALTON, R. M.; ROMAN, E. R.; NEGREDO, A. A.; WILHELMI, I. D.; GLASS, R. I.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 21, n. 11, p. 1038-1041, Nov. 2002.
- DE GRAZIA, S.; GIAMMANCO, G. M.; COLOMBA, C.; CASCIO, A.; ARISTA, S. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Italian children with gastroenteritis. **Clinical Microbiology Infection**, v. 10, n. 11, p. 1025-1029, Nov. 2004.
- DENNEHY, P. H.; NELSON, S. M.; SPANGENBERGER, S.; NOEL, J. S.; MONROE, S. S.; GLASS, R. I. A prospective case-control study of the role of astrovirus in acute diarrhea among hospitalized young children. **Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 1, p. 10-15, Jul. 2001.
- DONELLI, G.; SUPERTI, F.; TINARI, A.; MARZIANO, M. L. Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells. **Journal of Medical Virology**, v. 38, n. 4, p. 271-277, Dec. 1992.
- ESAHLI, H.; BREBACK, K.; BENNET, R.; EHRNST, A.; ERIKSSON, M.; HEDLUND, K. O. Astroviruses as a cause of nosocomial outbreaks of infant diarrhea. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 10, n. 7, p. 511-515, Jul. 1991.
- ESPUL, C.; MARTÍNEZ, N.; NOEL, J. S.; CUELLO, H.; ABRILE, C.; GRUCCI, S.; GLASS, R.; BERKE, T.; MATSON, D. O. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. **Journal of Medical Virology**, v. 72, n. 1, p. 75-82, Jan. 2004.
- FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H. Virus particles in gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, n. 7844, p. 1497, Dec. 1973.
- FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H.; MORRIS, C. A. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. **Lancet**, v. 1, n. 7897, p. 4-5, Jan. 1975.
- FODHA, I.; CHOUIKHA, A.; PEENZE, I.; DE BEER, M.; DEWAR, J.; GEYER, A.; MESSAADI, F.; TRABELSI, A.; BOUJAAFAR, N.; TAYLOR, M. B.; STEELE, D. Identification of viral agents causing diarrhea among children in the Eastern Center of Tunisia. **Journal of Medical Virology**, v. 78, n. 9, p. 1198-1203, Sep. 2006.

FORD-JONES, E. L.; MINDORFF, C. M.; GOLD, R.; PETRIC, M. The incidence of viral-associated diarrhea after admission to a pediatric hospital Am. **Journal Epidemiol**, v. 131, n. 4, p. 711-718, Apr. 1990.

GABBAY, Y. B.; CHAMONE, C. B.; NAKAMURA, L. S.; OLIVEIRA, D. S.; ABREU, S. F.; CAVALCANTE-PEPINO, E. L.; MASCARENHAS, J. D. P.; LEITE, J. P. G.; LINHARES, A. C. Characterization of an astrovirus genotype 2 strain causing an extensive outbreak among Maxakali Indians, Southeast Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 37, n. 4, p. 287-292, Dec. 2006.

GABBAY, Y. B.; DA LUZ, C. R.; COSTA, I. V.; CAVALCANTE-PEPINO, E. L.; SOUSA, M. S.; OLIVEIRA, K. K.; WANZELLER, A. L.; MASCARENHAS, J. D.; LEITE, J. P.; LINHARES, A. C. Prevalence and genetic diversity of astrovirus in children with and without diarrhea in São Luís, Maranhão, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 709-714, Nov. 2005.

GABBAY, Y. B.; LEITE, J. P. G.; OLIVEIRA, D. S.; NAKAMURA, L. S.; NUNES, M. R.; MASCARENHA, J. D.; HEINEMANN, M. B.; LINHARES, A. C. 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 Research**, 2007a. In press.

GABBAY, Y. B.; LINHARES, A. C.; CAVALCANTE-PEPINO, E. L.; NAKAMURA, L. S.; OLIVEIRA, D. S.; DA SILVA, L. D.; MASCARENHAS, J. D.; OLIVEIRA, C. S.; MONTEIRO, T. A.; LEITE, J. P. Prevalence of human astrovirus genotypes associated with acute gastroenteritis among children in Belém, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 5, p. 530-538, May. 2007b.

GABBAY, Y. B.; LINHARES, A. C.; OLIVEIRA, D. S.; NAKAMURA, L. S.; MASCARENHAS, J. D.; GUSMÃO, R. H.; HEINEMANN, M. B.; MACÊDO, O.; LEITE, J. P. 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 531-534, Jun. 2007c.

GABBAY, Y. B.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; LINHARES, A. C.; FREITAS, R. B.; MASCARENHAS, J. D. P. Resultados obtidos por microscopia eletrônica em espécimes fecais de indivíduos residentes em Belém, PA. In: VIROLÓGICA, 91., E SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ARBOVÍRUS DOS TRÓPICOS E FEBRES HEMORRÁGICAS, 2. 1994. **Resumos...** Belém: Instituto Evandro Chagas; FNS; Universidade Federal do Pará, Sociedade Brasileira de Virologia, 1994. p. 399-407.

GAGGERO, A.; O'RYAN, M.; NOEL, J. S.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S.; MAMANI, N.; PRADO, V.; AVENDANO, L. F. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3691-3693, Dec. 1998.

GALLIMORE, C. I.; TAYLOR, C.; GENNERLY, A. R.; CANT, A. J.; GALLOWAY, A.; LEWIS, D.; GRAY, J. J. Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3890-3894, Aug. 2005.

GEIGENMÜLLER, U.; CHEW, T.; GINZTON, N.; MATSUI, S. M. Processing of nonstructural protein 1a of human astrovirus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 4, p. 2003-2008, Feb. 2002a.

GEIGENMÜLLER, U.; GINZTON, N. H.; MATSUI, S. M. Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. **Journal of General Virology**, v. 83, n. Pt. 7, p. 1691-1695, Jul. 2002b.

GIORDANO, M. O.; FERREYRA, L. J.; ISA, M. B.; MARTINEZ, L. C.; YUDOWSKY, S. I.; NATES, S. V. The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children in Cordoba city, Argentina: an insight of disease burden. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 4, p. 193-197, Jul. – Agu. 2001.

GIORDANO, M. O.; MARTINEZ, L. C.; ISA, M. B.; PAEZ REARTE, M.; NATES, S. V. Childhood astrovirus-associated diarrhea in the ambulatory setting in a public hospital in Cordoba city, Argentina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 2, p. 93-96, Mar. – Abr. 2004.

GIORDANO, M. O.; MARTINEZ, L. C.; RINALDI, D.; ESPUL, C.; MARTINEZ, N.; ISA, M. B.; DEPETRIS, A. R.; MEDEOT, S. I.; NATES, S. V. Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 15, n. 16, p. 1427-32, Nov. 1999.

GLASS, R. I.; NOEL, J. S.; MITCHELL, D.; HERRMANN, J. E.; BLACKLOW, N. R.; PICKERING, L. K.; DENNEHY, P.; RUIZ-PALACIOS, G.; DE GUEREIRO, M. L.; MONROE, S. S. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. **Archives of Virology**, v. 12, p. 287-300, 1996.

GÓMEZ-LÓPEZ, A.; DÍEZ, R.; COPERÍAS, J. L.; GUEVARA, C. L. Infección por astrovirus en niños con gastroenteritis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica**, v. 19, n. 5, p. 199-201, May. 2001.

GOUGH, R. E.; COLLINS, M. S.; BORLAND, E.; KEYMER, L. F. Astrovirus-like particles associated with hepatitis in ducklings. **Veterinary Record**, v. 114, n. 11, p. 114: 279, Mar. 1984.

GRAY, J. J.; WREGHITT, T. G.; CUBITT, W. D.; ELLIOT, P. R. An outbreak of gastroenteritis in a home for elderly associated with astrovirus type 1 and human calicivirus. **Journal of Medical Virology**, v. 23, n. 4, p. 377-381, Dec. 1987.

GRIMM, A. C.; CASHDOLLAR, J. L.; WILLIAMS, F. P.; FOUT, G. S. Development of an astrovirus RT-PCR detection assay for use with conventional real-time, and integrated cell culture/RT-PCR. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 269-278, Apr. 2004.

GROHMANN, G. S.; GLASS, R. I.; PEREIRA, H. G.; MONROE, S. S.; HIGHTOWER, A. W.; WEBER, R.; BRYAN, R. T. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. Enteric Opportunistic Infections Working Grup. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 1, p. 14-20, Jul. 1993.

GUERRANT, R. L.; HUGHES, J. M.; LIMA, N. L.; CRANE, J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12, p. 41-50, Jan. – Feb. 1990. Suplemento 1

GUERRERO, M. L.; NOEL, J. S.; MITCHELL, D.K.; CALVA, J. J.; MORROW, A. L.; MARTINEZ, J.; ROSALES, G.; VELAZQUEZ, F. R.; MONROE, S. S.; GLASS, R. I.; PICKERING, L. K.; RUIZ-PALACIOS, G. M. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. **Pediatric Infectious Disease J**, v. 17, n. 8, p. 723-727, Aug. 1998.

GUSMÃO, R. H.; MASCARENHAS, J. D.; GABBAY, Y. B.; LINS-LAISON, Z.; RAMOS, F. L.; MONTEIRO, T. A.; VALENTE, S. A.; FAGUNDES-NETO, U.; LINHARES, A. C. Rotavirus subgroups, G serotypes, and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belém, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 45, n. 2, p. 81-86, Apr. 1999.

GUIX, S.; CABALLERO, S.; BOSCH, A.; PINTÓ, R. M. Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication. **Virology**, v. 333, n. 1, p. 124-131, Mar. 2005.

GUIX, S.; CABALLERO, S.; VILLENA, C.; BARTOLOME, R.; LATORRE, C.; RABELLA, N.; SIMO, M.; BOSCH, A.; PINTO, R. M. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 133-139, Jan. 2002.

GUIX, S.; BOSCH, A.; RIBES, E.; MARTINEZ, L. D.; PINTÓ, R. M. Apoptosis in a astrovirus-infected CaCo-2cells. **Virology**, v. 319, n. 2, p. 249-261, Feb. 2004.

HERRMANN, J. E.; HODSON, R. W.; PERRON-HENRY, D. M.; KURTZ, J. B.; BLACKLOW, N. R. Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 158, n. 1, p. 182-185, Jul. 1988.

HERRMANN, J. E.; NOWAK, N. A.; PERRON-HENRY, D. M.; HUDSON, R. W.; CUBITT, W. D.; BLACKLOW, N. R. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 2, p. 226-229, Feb. 1990.

HERRMANN, J. E.; TAYLOR, D. N.; ECHEVERRIA, P.; BLACKLOW, N. R. Astrovirus as a cause of gastroenteritis in children. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 25, p. 1757-1760, Jun. 1991.

IMADA, T.; YAMAGUCHI, S.; MASE, M.; TSUKAMOTO, K.; KUBO, M.; MOROOKA, A. Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA **Journal of Virology**, v. 74, n. 18, p. 8487-8493, Sep. 2000.

JAKAB, F.; MELEG, E.; BÁNYAI, K.; MELEGH, B.; TÍMÁR, L.; PÉTERFAI, J.; SZÜCS, G. One-year survey of astrovirus infection in children with gastroenteritis in a large hospital in Hungary: occurrence and genetic analysis of astroviruses. **Journal of Medical Virology**, v. 74, n. 1, p. 71-77, Sep. 2004.

JIANG, B.; MONROE, S. S.; KOONIN, E. V.; STINE, S. E.; GLASS, R. I. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 22, p. 10539-10543, Nov. 1993.

JONASSEN, C. M.; JONASSEN, T. O.; SAIF, Y. M.; SNODGRASS, D. R.; USHIJIMA, H.; SHIMIZU, M.; GRINDE, B. Comparison of capsid sequences from human and animal astrovirus. **Journal of General Virology**, v. 82, n. Pt 5, p. 1061-1067, May. 2001.

KANG, Y. H.; PARK, Y. K.; AHN, J. B.; YEUN, J. D.; JEE, Y. M. Identification of human astrovirus infections from stool samples with diarrhea in Korea. **Archives of Virology**, v. 147, n. 9, p. 1821-1827, Sep. 2002.

KAPIKIAN, A. Z.; WYATT, R. G.; DOLIN, R.; THORNHILL, T. S.; KALICA, A. R.; CHANOCK, R. M. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. **Journal of Virology**, v. 10, n. 5, p. 1075-81, Nov. 1972.

KIULIA, N. M.; MWENDA, J.M.; NYACHIEO, A.; NYAUNDI, J. K.; STEELE, A. D.; TAYLOR, M. B. Astrovirus infection in young children with diarrhoea. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 53, n. 3, p. 206-209, Jun. 2007.

KOCI, M.D. Immunity and resistance to astrovirus infection. **Viral Immunology**, v. 18, n. 1, p. 11-16, 2005.

- KOCI, M. D.; KELLEY, L. A.; LARSEN, D.; SCHULTZ-CHERRY, S. Astrovirus-induced synthesis of nitric oxide contributes to virus control during infection. **Journal of Virology**, v. 78, n. 3, p. 1564-1574, Feb. 2004.
- KOCI, M. D.; MOSER, L. A.; KELLEY, L. A.; LARSEN, D.; BROWN, C. C.; SCHULTZ-CHERRY, S. Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. **Journal of Virology**, v. 77, n. 21, p. 11798-11808, Nov. 2003.
- KOCI, M. D.; SEAL, B. S.; SCHULTZ-CHERRY, S. Molecular characterization of an avian astrovirus. **Journal of Virology**, v. 74, n. 13, p. 6173-6177, Jul. 2000.
- KOMORIYA, T.; KOHNO, H.; KIMURA, A.; USHIJIMA, H. The development of sensitive latex agglutination tests for detecting astroviruses (serotypes 1 and 3) from clinical stool specimen. **Rinsho Biseibutsu Jinsoku Shindan Kenkyukai shi = JARMAM : Journal of the Association for Rapid Method and Automation in Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 103-14, 2003.
- KONNO, T.; SUZUKI, H.; ISHIDA, N.; CHIBA, R.; MOCHIZUKI, K.; TSUNODA, A. Astrovirus-associated epidemic gastroenteritis in Japan. **Journal of Medical Virology**, v. 9, n. 1, p. 11-7, 1982.
- KOOPMANS, M. P.; BIJEN, M. H.; MONROE, S. S.; VINJÉ, J. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 1, p. 33-37, Jan. 1998.
- KRISHNA, N. K. Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. **Viral Immunology**, v. 18, n. 1, p. 17-26, 2005.
- KRISTON, S.; WILLCOCKS, M. M.; CARTER, M. J.; CUBITT, W. D. Seroprevalence of atrovirus type 1 and 6 in London, determined using recombinant virus antigen. **Epidemiology and Infection**, v. 117, n. 1, p. 159-164, Aug. 1996.
- KURTZ, J. B.; LEE, T. W. Astroviruses: human and animal. In: BOCK, G.; WHELAN, J. (Ed.). **Novel diarrhea viruses**. New York: John Wiley & Sons, p. 92-107, 1987. (Ciba Foundation Symposium 128).

KURTZ, J. B.; LEE, T. W.; CRAIG, J. W.; REED, S. E. Astrovirus infection in volunteers. **Journal of Medical Virology**, v. 3, n. 3, p. 221-230, 1979.

KURTZ, J. B.; LEE, T. W.; PARSONS, A. J. The action of alcohols on rotavirus, astrovirus and enterovirus. **Journal of Hospital Infection**, v. 1, n. 4, p. 321-325, Dec. 1980.

LEBARON, C. W.; FURUTAN, N. P.; LEW, J. F.; ALLEN, J. R.; GOUVEA, V.; MOE, C.; MONROE, S. S. Viral agents of gastroenteritis. Public health importance and outbreak management. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 39, n. RR-5, p. 1-24, Apr. 1990.

LE CANN, P.; RANARIJOANA, S.; MONPOEHO, S.; LE GUYADER, F.; FERRÉ, V. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 1, p. 11-15, Jan. - Feb. 2004.

LE GUYADER, F. ; HAUGARREAU, L. ; MIOSSEC, L. ; DUBOIS, E. ; POMMEPUY, M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p.3241-3248, Aug. 2000.

LEE, T. W.; KURTZ, J. B. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. **Journal of General Virology**, v. 57, pt 2, p. 421-424, Dec. 1981.

LEE, T. W.; KURTZ, J. B. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. **Epidemiology and Infection**, v. 112, b. 1, p. 187-193, Feb. 1994.

LEITE, J. P.; BARTH, O. M.; SCHATZMAYR, H. G. Astrovirus in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 4, p. 489-490, Oct. - Dec. 1991.

LEW, J. F.; MOE, C. L.; MONROE, S. S.; ALLEN, J. R.; HARRISON, B. M.; FORRESTER, B. D.; STINE, S. E.; WOODS, P. A.; HIERHOLZER, J. C.; HERRMANN, J. E.; BLACKLOW, N. R.; BARTLETT, A. V.; GLASS, R. I. Astrovirus and adenovirus associated with diarrhea in children in day care settings. **Journal of Infectious Diseases**, v. 164, n. 4, p. 673- 678, Oct. 1991.

LEWIS, D. C.; LIGHTFOOT, N. F.; CUBITT, W. D.; WILSON, S. A. Outbreaks of astrovirus type 1 and rotavirus gastroenteritis in a geriatric inpatient population. **Journal of Hospital Infection**, v. 14, n. 1, p. 9-14, Jul. 1989.

LEWIS, T. L.; GREENBERG, H. B.; HERRMANN, J. E.; SMITH, L. S.; MATSUI, S. M. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral structural protein. **Journal of Virology**, v. 68, n. 1, p. 77-83, Jan. 1994.

LINHARES, A. C.; BRESEE, J. S. Rotavírus vaccines and vaccination in Latin America. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 8, n. 5, p. 305-331, Nov. 2000.

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P.; FREITAS, R. B.; OLIVEIRA, C. S.; BELLESI, N.; MONTEIRO, T. A. F.; LINS-LAISON, Z.; RAMOS F. L. P.; VALENTE, S. A. Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil. **Bulletin World Health Organization**, v. 74, n. 5, p. 491-500, 1996.

LINHARES, M. I. S.; DE ANDRADE, G. P.; MAGALHÃES, M., OKUSAWA E.; CAMPOS, T. A. S.; MINEMATSU, T.; EIZURU, Y.; MINAMISHIMA, Y. Viral agents in children with and without diarrhoea in Recife-Pe-Brazil, 1989. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 5., São Lourenço, 1990. **Resumos...** São Lourenço: Sociedade Brasileira de Virologia, p. 67, 1990.

LUKASHOV, V. V.; GOUDSMIT, J. Evolutionary relationships among Astroviridae. **Journal of General Virology**, v. 83, pt 6, p. 1397-1405, Jun. 2002.

LUZ, C. R.; MASCARENHAS, J. D.; GABBAY, Y. B.; MOTTA, A. R.; LIMA, T. V.; SOARES, L. D. A. S.; LINHARES, A. C. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 287-93, Sep. - Oct. 2005.

MADELEY, C. R.; COSGROVE, B. P. 28nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, n. 7932, p. 451-452, Sep. 1975.

MALDONADO, Y.; CANTWELL, M.; OLD, M.; HILL, D.; SANCHEZ, M. L.; LOGAN, L.; MILLAN-VELASCO, F.; VALDESPINO, J. L.; SEPULVEDA, J.; MATSUI, S. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 2, p. 334-339, Aug. 1998.

MARIE-CARDINE, A.; GOURLAIN, K.; MOUTERDE, O.; CASTIGNOLLES, N.; HELLOT, M. F.; MALLET, E.; BUFFET-JANVRESSE, C. Epidemiology of acute viral gastroenteritis in children hospitalized in Rouen, France. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 9, p. 1170-1178, May. 2002.

MARSHALL, J. A.; BRUGGINK, L. D.; STURGE, K.; SUBASINGHE, N.; TAN, A.; HOGG, G. G. Molecular features of astrovirus associated with a gastroenteritis outbreak in an aged-care centre. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, n. 1, p. 67-71, Jan. 2007.

MATSUI, S. M.; GREENBERG, H. B. Astroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 4 th ed. Philadelphia: Lippincott, 2001. p. 875-893.

MATSUI, M.; USHIJIMA, H.; HACHIYA, M.; KAKIZAWA, J.; WEN, L.; OSETO, M.; MOROOKA, K.; KURTZ, J. B. Determination of serotypes of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. **Microbiology Immunology**, v. 42, n. 8, p. 539-547, 1998.

MATSUI, S. M.; KIANG, D.; GINZTON, N.; CHEW, T.; GEIGENMÜLLER-GNIRKE, U. Molecular biology of astroviruses: selected highlights. **Novartis Foundation Symposium**, v. 238, p. 219-233, 2001.

MEDINA, S. M.; GUITIERREZ, M. F.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J. E. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3481-3483, Sep. 2000.

MENDES, Y. G. **Soroepidemiologia do vírus Norwalk e do astrovírus em crianças de Belém, Pará, Brasil**. 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 1997.

- MÉNDEZ, E.; ARIAS, C. F. Astroviruses. In: KNIPE, D. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; STRAUS, S. E.; HOWLEY, P. M.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B. (Ed.) **Fields Virology**. 5 th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wikins, 2007. p 982-1000.
- MENDEZ, E.; FERNANDEZ-LUNA, T.; LOPEZ, S.; MENDEZ-TOSS, M.; ARIAS, C. F. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. **Journal of Virology**, v. 76, n. 16, p. 7996-9002, Aug. 2002.
- MÉNDEZ, E.; SALAS-OCAMPO, E.; ARIAS, C. F. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. **Journal of Virology**, v. 78, n. 16, p. 8601-8608, Aug. 2004.
- MÉNDEZ, E.; SALAS-OCAMPO, M. P.; MUNGUÍA, M. E.; ARIAS, C. F. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. **Journal of Virology**, v. 77, n. 21, p. 11378-11384; Nov. 2003.
- MÉNDEZ-TOSS, M.; GRIFFIN, D. D.; CALVA, J.; CONTRERAS, J. F.; PUERTO, F. I.; MOTA, F.; GUISCAFRÉ, H.; CEDILLO, R.; MUNÓZ, O.; HERRERA, I.; LÓPEZ, S.; ARIAS, C. F. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. **Journal of Clinical microbiology**, v. 42, n. 1, p. 151-157, Jan. 2004.
- MÉNDEZ-TOSS, M.; ROMERO-GUIDO, P.; MUNGUÍA, M. E.; MÉNDEZ, E.; ARIAS, C. F. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. **Journal of General Virology**, v. 81, pt. 12, p. 2891-2897, Dec. 2000.
- MIDTHUN, K.; GREENBERG, H. B.; KURTZ, J. B.; GARY, G. W.; LIN, F. Y. C.; KAPIKIAN, A. Z. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 955-962, Apr. 1993.
- MIOSSEC, L.; LE GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; POMMEPUY, M. Magnitude of rainfall on viral contamination of the marine environment during gastroenteritis epidemics in human coastal population [in Franch]. **Revue D'épidémiologie et de Santé Publique**, v. 48, p. 2S62-2S71, Aug. 2000. Suplemento 2.

MIRANDA, V. Q. S. **Detecção e caracterização molecular de astrovírus em crianças menores de dois anos com gastroenterite aguda no Município do Rio de Janeiro**. 2004. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

MITCHELL, D. K.; MONROE, S. S.; JIANG, X.; MATSON, D. O.; GLASS, R. I.; PICKERING, L. K. Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p.1437-1444, Dec. 1995.

MITCHELL, D. K. Astrovirus gastroenteritis. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 21, n. 11, p. 1067-1069, Nov. 2002.

MITCHELL, D. K.; MATSON, D. O.; CUBITT, W. D.; JACKSON, L. J.; WILLCOCKS, M. M.; PICKERING, L. K.; CARTER, M. J. Prevalence of antibodies to astrovirus types 1 and 3 in children and adolescents in Norfolk, Virginia. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 18, n. 3, p. 249-254, Mar. 1999a.

MITCHELL, D. K.; MATSON, D. O.; JIANG, X.; BERKE, T.; MONROE, S. S.; CARTER, M. J.; WILLCOCKS, M. M.; PICKERING, L. K. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 2, p. 514-517, Aug. 1999b.

MONCEYRON, C.; GRINDE, B.; JONASSEN, T. O. Molecular characterization of the 3'-end of the astrovirus genome. **Archives of Virology**, v. 142, n. 4, p. 699-706, 1997.

MONROE, S. S.; CARTER, M. J.; HERRMANN, J. E.; MITCHELL, D. K.; SANCHEZ-FAUQUIER, A. Family Astroviridae. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J., DESSELBERGER, U.; BALL, L. A (Ed.), *Virus taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier/Academic Press, p 859-864. 2005.

MONROE, S. S.; JIANG, B.; STINE, S. E.; KOOPMANS, M.; GLASS, R. I. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. **Journa of Virology**, v. 67, n. 6, p. 3611-3614, Jun. 1993.

- MONROE, S. S.; STINE, S. E.; GORELKIN, L.; HERRMANN, J. E.; BLACKLOW, N. R.; GLASS, R. I. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. **Journa of Virology**, v. 65, n. 2, p. 641-648, Feb. 1991.
- MORSY EL-SENOUSY, W.; GUIX, S.; ABID, I.; PINTÓ, R. M.; BOSCH, A. Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 164-167, Jan. 2007.
- MOSER, L. A.; SCHULTZ-CHERRY, S. Pathogenesis of astrovirus infection. **Viral Immunology**, v. 18, n. 1, p. 4-10, 2005.
- MUSTAFA, H.; PALOMBO, E. A.; BISHOP, R. F. Improved sensitivity of astrovirus-specific RT-PCR following culture of stool samples in CaCo-2 cells. **Journal of Clinical Virology**, v. 11, n. 2, p. 103-107, Aug. 1998.
- MUSTAFA, H.; PALOMBO, E. A.; BISHOP, R. F. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1058-1062, Mar. 2000.
- NADAN, S.; WALTER, J. E.; GRABOW, W. O.; MITCHELL, D. K.; TAYLOR, M. B. Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: Comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 747-753, Feb. 2003.
- NAFICY, A. B.; RAO, M. R.; HOLMES, J. L.; ABU-ELYAZEED, R.; SAVARINO, S. J.; WIERZBA, T. F.; FRENCK, R. W.; MONROE, S. S.; GLASS, R. I.; CLEMENS, J. D. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. **Journal of Infectious diseases**, v. 182, n. 3, p. 685-690, Sep. 2000.
- NOEL, J. S.; LEE, T. W.; KURTZ, J. B.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 797-801, Apr. 1995.

- NOZAWA, C. M.; VAZ, M. G. S.; GUIMARÃES, M. A. A. Detection of astrovirus-like in diarrhoeic stool and its coexistence with rotavirus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, n. 5, p. 238-241, Sep. – Oct. 1985.
- OH, D. Y.; GAEDICKE, G.; SCHREIER, E. Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity. **Journal of Medical Virology**, v. 71, n. 1, p. 82-93, Sep. 2003.
- OISHI, I.; YAMAZAKI, K.; KIMOTO, T.; MINEKAWA, Y.; UTAGAWA, E.; YAMAZAKI, S.; INOUE, S.; GROHMANN, G. S.; MONROE, S. S.; STINE, S. E.; CARCAMO, C.; ANDO, T.; GLASS, R. I. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 2, p. 439-443, Aug. 1994.
- OKITSU-NEGISHI, S.; NGUYEN, T. A.; PHAN, T. G.; USHIJIMA, H. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. **Pediatrics International** 46: v. 46, n. 2, p. 245-252, Apr. 2004.
- PANG, X. L.; VESIKARI, T. Human astrovirus-associated gastroenteritis in children under 2 years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. **Acta Paediatrica**, v. 88, n. 5, p. 532-536, May. 1999.
- PARASHAR, U. D. ; GIBSON, C. J. ; BRESSE, J. S ; GLASS, R. I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 304-306, Feb. 2006.
- PENNAP, G.; PAGER, C. T.; PEENZE, I.; BEER, M. C.; KWAGA, J. K.; OGALLA W. N.; UMOH, J. U.; STEELE, A. D. Epidemiology of astrovirus infection in Zaria, Nigeria. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 48, n. 2, p. 98-101, Apr. 2002.
- PHILLIPS, A. D.; RICE, S. J.; WALKER-SMITH. Astrovirus within human small intestinal mucosa. **Gut**, v. 23, p. A923-A924, 1982.
- POLOMBO, E. A.; BISHOP, R. F. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1750-1753, Jul. 1996.

RÁCZ, M. L. Diagnóstico laboratorial das infecções virais. In: MICROBIOLOGIA. São Paulo: Atheneu, 2004.

RISCO, C.; CARRASCOSA, J. L.; PEDREGOSA, A. M.; HUMPHREY, C. D.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. **Journal of General Virology**, v. 76, pt. 8, p. 2075-2080, Aug. 1995.

RODRIGUEZ-BAEZ, N.; O'BRIEN, R.; QUI, S. Q.; BASS, D. M. Astrovirus, adenovirus, and rotavirus in hospitalized children: Prevalence and association with gastroenteritis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 35, n. 1, p. 64-68, Jul. 2002.

ROHAYEM, J.; BERGER, S.; JURETZEK, T.; HERCHENRÖDER, O.; MOGEL, M.; POPPE, M.; HENKER, J.; RETHWILM, A. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect norovirus, astrovirus and adenovirus in clinical stool samples. **Journal of Virological Methods**, v. 118, n. 1, p. 49-59, Jun. 2004.

ROYUELA, E.; NEGREDO, A.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. **Journal of Virological Methods**, v. 133, n. 1, p.14-19, Apr. 2006.

SAKAMOTO, T.; NEGIDHI, H.; WANG, Q. H.; AKIHARA, S.; KIM, B.; NISHIMURA, S.; KANESHI, K.; NAKAYA, S.; UEDA, Y.; SUGITA, K.; MOTOHIRO, T.; NISHIMURA, T.; USHIJIMA, H. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). **Journal of Medical Virology**, v. 61, n. 3, p. 326-331, Jul. 2000.

SAKON, N.; YAMAZAKI, K.; UTAGAWA, E.; OKUNO, Y.; OISHI, I. Genomic characterization of human astrovirus type 6 Katano vírus and the establishment of a rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus. **Journal of Medical Virology**, v. 61, n. 1, p. 125-131, May. 2000.

SANCHEZ-FAUQUIER, A.; CARRASCOSA, A. L.; CARRASCOSA, J. L.; OTERO, A.; GLASS, R. I.; LOPEZ, J. A.; SAN MARTIN, C.; MELERO, J. A. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. **Virology**, v. 201, n. 2, p. 312-320, Jun. 1994.

SANTOS, R. A.; BORGES, A. M.; DA COSTA, P. S.; TEIXEIRA, J. M.; GIUGLIANO, L. G.; LEITE, J. P.; CARDOSO, D. D. Astrovirus infection in children living in the Central West region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 2, p. 209-213, May. 2007.

SANTOS, R. A. T.; CARDOSO, D. D. P. Astrovirus (Revisão). **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 3, p. 161-174, 2005.

SCHNAGL, R. D.; BELFRAGE, K.; FARRINGTON, R.; HUTCHINSON, K.; LEWIS, V.; ERLICH, J.; MOREY, F. Incidence of human astrovirus in Central Australia (1995 to 1998) and comparison of deduced serotypes detected from 1981 to 1998. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4114-4120, Nov. 2002.

SEBIRE, N. J.; MALONE, M.; SHAH, N.; ANDERSON, G.; GASPAR, H. B.; CUBITT, W. D. Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a pediatric bone marrow transplant recipient. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 57, n. 9, p. 1001-1003, Sep. 2004.

SHASTRI, S.; DOANE, A. M.; GONZALES, J.; UPADHYAYULA, U.; BASS, D. M. Prevalence of astroviruses in a children's hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2571-2574, Sep. 1998.

SILVA, A. M.; LEITE, E. G.; ASSIS, R. M.; MAJEROWICZ, S.; LEITE, J. P. An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 in a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1069-1073, Nov. 2001.

SILVA, A. M. V. Detecção de astrovirus em fezes de crianças com gastroenterite no Estado do Rio de Janeiro. Tese de Mestrado em Biologia Celular e Molecular - **Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. 1998.**

SILVA, P. A.; CARDOSO, D. D.; SCHREIER, E. Molecular characterization of human astroviruses isolated in Brazil, including the complete sequences of astrovirus genotypes 4 and 5. **Archives of Virology**, v. 151, n. 7, p. 1405-1417, Jul. 2006.

SINGH, P. B.; SREENIVASAN, M. A.; PAVRI, K. M. Viruses in acute gastroenteritis in children in Pune, India. **Epidemiology and Infection**, v. 102, n. 2, p. 345-353, Apr. 1989.

- STEELE, A. D.; BASETSE, H. R.; BLACKLOW, N. R.; HERRMANN, J. E. Astrovirus infection in South Africa: a pilot study. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 18, n. 4, p. 315-319, Dês. 1998.
- STEWIEN, K. E.; DURIGON, E. L.; TANAKA, H.; GILIO, A. E.; BALDACCI, E. R. Ocorrência de astrovírus humanos na cidade de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 25, n. 2, p. 157-158, Apr. 1991.
- SUPERTI, F.; SEGANTI, L.; ORSI, N.; DESIDERI, N.; STEIN, M. L.; TINARI, A.; MARZIANO, M. L.; DONELLI, G. In vitro effect of synthetic flavanoids on astrovirus infection. **Antiviral Research**, v. 13, n. 4, p. 201-208, Apr. 1990.
- TAI, J. H.; EWERT, M. S.; BELLLOT, G.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Development of a rapid method using nucleic acid sequence-based amplification for the detection of astrovirus. **Journal of Virological Methods**, v. 110, n. 2, p. 119-127, Jun. 2003.
- TANAKA, H.; KISIELIUS, J. J.; UEDA, M.; GLASS, R. I.; JOAZEIRO, P. P. Intrafamilial outbreak of astrovirus gastroenteritis in São Paulo, Brazil. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, v. 12, n. 3, p. 219-221, Sep. 1994.
- TAYLOR, M. B.; COX, N.; VERY, M. A.; GRABOW, W. O. The occurrence of hepatitis A and astroviruses in selected river and dam waters in South Africa. **Water Research**, v. 35, n. 11, p. 2653-2660, Aug. 2001.
- TAYLOR, M. B.; GRABOW, W. O.; CUBITT, W. D. Propagation of human astrovirus in the PLC/PRF/5 hepatoma cell line. **Journal of Virological Methods**, v. 67, n. 1, p. 13-18, Aug. 1997.
- TIMENETSKY, M. do. C.; KISIELIUS, J. J.; GRISI S. J.; ESCOBAR, A. M.; UEDA, M.; TANAKA, H. Rotavírus, adenovírus, astrovírus, calicivírus e “small round vírus particles” em fezes de crianças, com e sem diarreia aguda, no período de 1987 a 1988, na grande São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 3, p. 275-280, May. – Jun. 1993.
- TREVIÑO, M.; PRIETO, E.; PEÑALVER, D.; AGUILERA, A.; GARCIA-ZABARTE, A.; GARCIA-RIESTRA, C.; REGUEIRO, B. J. Diarrea por adenovirus y astrovirus em pacientes inmunodeficientes hospitalizados. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 19, n. 1, p. 7-10, Jan. 2001.

UNICOMB, L. E.; BANU, N. N.; AZIM, T.; ISLAM, A.; BARDHAN, P. K.; FARUQUE, A. S.; HALL, A.; MOE, C. L.; NOEL, J. S.; MONROE, S.S.; ALBERT, M. J.; GLASS, R. I. Astrovirus infection in association with acute, persistent and nosocomial diarrhea in Bangladesh. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 17, n. 7, p. 611-614, Jul. 1998.

VAN HEMERT, F. J.; BERKHOUT, B.; LUKASHOV, V. V. Host-related nucleotide composition and codon usage as driving forces in the recent evolution of the Astroviridae. **Virology**, v. 361, n. 2, p. 447-54, May. 2007.

VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LEITE, J. P.; MIAGOSTOVICH, M. P. Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Virology**, 2007. In press.

WALKER-SMITH, J. A.; SANDHU, B. K.; ISOLAURI, E.; BANCHINI, G.; VAN CAILLIE-BERTRAND, M.; DIAS JA, FASANO A, GUANDALINI S, HOEKSTRA JH, JUNTUNEN M, KOLACEK S, MARX D, MICETIC-TURK D, RAZENBERG MC, SZAJEWSKA H, TAMINIAU J, WEIZMAN Z, ZANACCA C, ZETTERSTRÖM R. Guidelines prepared by the ESPGAN Working Group on Acute Diarrhoea. Recommendations for feeding in childhood gastroenteritis. European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 24, n. 5, p. 619-620, May 1997.

WALTER, J. E.; MITCHELL, D. K. Astrovirus infection in children. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 247-253, Jun. 2003.

WALTER, J. E.; MITCHELL, D. K. Role of astroviruses in childhood diarrhea **Current Opinion in Pediatrics**, v. 12, n. 3, p. 275-279, Jun. 2000.

WALTER, J. E.; MITCHELL, D. K.; GUERREIRO, M. L.; BERKE, T.; MADISON, D. O.; MONROE, S. S.; PICKERING, L. K.; RUIZ-PALACIOS, G. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico city. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 5, p. 681-683, Mar. 2001.

- WANG, Q. H.; KAKIZAWA, J.; WEN, L. Y.; SHIMIZU, M.; NISHIO, O.; FANG, Z. Y.; USHIJIMA, H. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. **Journal of Medical Virology**, v. 64, n. 3, p. 245-255, Jul. 2001.
- WATKINS, J. S. Astrovirus gastroenteritis on a geriatric ward. **Communicable Disease Report**, v. 84, p. 3, 1984.
- WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 4, p. 247-262, Apr. 2003.
- WILLCOCKS, M. M.; BOXALL, A. S.; CARTER, M. J. Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins. **Journal of General Virology**, v. 80, pt. 10, p. 2607-2611, Oct. 1999.
- WILLCOCKS, M. M.; BROWN, T. D.; MADELEY, C. R.; CARTER, M. J. The complete sequence of a human astrovirus. **Journal of General Virology**, v. 75, pt 7, p. 1785-1988, Jul. 1994.
- WILLCOCKS, M. M.; CARTER, M. J. The 3' terminal sequence of a human astrovirus. *Arch Virol*, v. 124, n. 3-4, p. 279-289, 1992.
- WILLCOCKS, M. M.; CARTER, M. J.; LAIDLER, F. R.; MADELEY, C. R. Growth and characterization of human faecal astrovirus in a continuous cell line. **Archives of Virology**, v. 113, n. 1-2, p. 73-81, 1990.
- WILLCOCKS, M.; KURTZ, J.; LEE, T. W.; CARTER, M. Prevalence of human astrovirus serotype 4: capsid protein sequence and comparison with other strains. **Epidemiology and Infection**, v. 114, n. 2, p. 385-394, Apr. 1995.
- YAN, H.; YAGYU, F.; OKITSU, S.; NISHIO, O.; USHIJIMA, H. Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. **Journal of Virological Vethods**, v. 114, n. 1, p. 37-44, Dec. 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A:

GABBAY YB, LINHARES AC, CAVALCANTE-PEPINO EL, NAKAMURA LS, OLIVEIRA DS, SILVA LD, MASCARENHAS JDP, OLIVEIRA CS, MONTEIRO TAF, LEITE JPG. Prevalence of Human Astrovirus Genotypes Associated With Acute Gastroenteritis Among Children in Belém, Brazil. Publicado na revista *Journal Medical Virology*, v. 79, p. 530-538, 2007.

Prevalence of Human Astrovirus Genotypes Associated With Acute Gastroenteritis Among Children in Belém, Brazil

Yvone B. Gabbay,^{1*} Alexandre C. Linhares,¹ Elielma L. Cavalcante-Pepino,¹ Lilianny S. Nakamura,¹ Darleise S. Oliveira,¹ Luciana Damascena da Silva,¹ Joana D'Arc P. Mascarenhas,¹ Consuelo S. Oliveira,¹ Talita Antônia F. Monteiro,¹ and José Paulo G. Leite²

¹Virology Section, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Ananindeua, Pará, Brazil

²Department of Virology, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Worldwide human astroviruses (HAstV) have increasingly been recognized as causative agents of viral gastroenteritis, mainly in infants and young children. The aim of this study was to assess the epidemiology and genotype diversity of HAstVs detected in children who participated in a trial in Belém, Brazil with the rhesus human reassortant rotavirus vaccine tetravalent (RRV-TV). From April/1990 to August/1992, 624 diarrheic stool samples were tested by enzyme immunoassay (EIA) for HAstV, with a positive rate of 4.0%. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was done in 129 samples (25 positive and 104 with twice the optical density (OD) value of negative control by EIA) being 33 positive. The overall positivity yielded by both methods was 5.4% (34/624). Genotyping of the 33 positive samples was done by type-specific RT-PCR and confirmed by sequence analysis. Phylogenetic analysis was performed using a 348-bp fragment of the ORF2 region of the capsid gene. HAstV-1 was the most prevalent, accounting for 45.5% of the isolates, followed by HAstV-2 (27.3%), HAstV-3 (12.1%), HAstV-4 (12.1%), and HAstV-6 (3.0%). The monthly distribution showed that HAstV-1 was predominant in the first year of study (May/1990 to May/1991) with highest prevalence in January/1991. HAstV-2 was predominant from July to November/1991 and HAstV-4 from September to October/1990. At 24 months of age, 30.6% of children had been infected by HAstV. The clinical symptoms registered during HAstV associated-diarrhea were usually mild. These data highlight the circulation of the different HAstV genotypes in Belém during the study period. **J. Med. Virol. 79:530–538, 2007.** © 2007 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: astroviruses; PCR-genotyping; sequencing; infants; diarrhea

INTRODUCTION

Human astroviruses (HAstVs) were first detected in 1975 in stool samples from children with acute gastroenteritis examined by electron microscopy [Appleton and Higgins, 1975; Madeley and Cosgrove, 1975]. With the improvement of the diagnostic methods, including the use of enzyme immunoassay (EIA) [Herrmann et al., 1991; Lew et al., 1991], and the recently developed molecular techniques [Noel et al., 1995; Sakamoto et al., 2000; Schnagl et al., 2002], a significant amount of data has been gathered highlighting the role of HAstV in the etiology of acute infantile gastroenteritis [Jakab et al., 2004].

Epidemiological studies conducted worldwide, have reported the occurrence of HAstVs infection among children hospitalized with diarrhea and in the context of community-based studies. Overall, prevalence rates have ranged from 2% to 16% in hospital-based studies and from 5% to 17% in community-acquired gastroenteritis [Polombo and Bishop, 1996; Walter and Mitchell, 2000; Méndez-Toss et al., 2004]. HAstVs have also been associated with outbreaks of diarrhea in children [Mitchell et al., 1999] and adults [Belliot et al., 1997]. HAstVs have also been recognized as a common cause of nosocomial diarrhea [Unicomb et al., 1998; Rodriguez-Baez et al., 2002] and was shown to be more severe among patients with HIV infection [Cunliffe et al., 2002].

HAstVs belong to the *Astroviridae* family, genera *Mamastrovirus*, and their genome is composed of a single-stranded positive sense RNA molecule containing

*Correspondence to: Yvone B. Gabbay, Virology Section, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Rodovia BR 316, Km 07, S/N, Levilândia, 67.030-000, Ananindeua, Pará, Brasil. E-mail: yvonegabbay@iec.pa.gov.br

Accepted 22 December 2006

DOI 10.1002/jmv.20813

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)

three open reading frames (ORFs). This comprises ORF1a and ORF1b at the 5' end of the genome, coding for the nonstructural viral proteins, and the ORF2, at the 3' end, which encodes the capsid precursor protein used to classify these viruses [Clark and McKendrick, 2003]. HAstVs have been classified into eight genotypes based on the nucleotide sequence of ORF2 region [Noel et al., 1995; Matsui and Greenberg, 2001] and they show a good correlation with the eight serotypes determined according to the reactivity of the capsid proteins with type-specific monoclonal antibodies [Sakamoto et al., 2000; Taylor et al., 2001].

Genotyping surveys have shown that HAstV-1 is the most frequent genotype, followed by HAstV-2, -3, -4, and -5 [Lee and Kurtz, 1994; Glass et al., 1996; Mustafa et al., 2000; Sakamoto et al., 2000]. Studies conducted in Brazil demonstrated a similar pattern, with HAstV-1 being predominant, and other genotypes such as HAstV 2–5 and 8 have been less commonly detected [Silva et al., 2001; Cardoso et al., 2002; Gabbay et al., 2005; Silva et al., 2006].

From April/1990 to August/1992, a large placebo-controlled efficacy trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine tetravalent (RRV-TV) was conducted involving children from Belém, Pará, Brazil. Altogether, 540 infants recruited to participate in this study, received either vaccine doses or placebo at 1, 3, and 5 months of age and were followed-up until 2 years of age. All gastroenteritis episodes were recorded and stool specimens were collected primarily for rotavirus studies. Some of these samples were further used for the purpose of astrovirus studies [Linhares et al., 1996].

The main objective of the present study was to determine the role of HAstVs in the etiology of acute gastroenteritis in children who were enrolled to participate in the RRV-TV trial. We focused mainly on the prevalence of HAstV-related gastroenteritis and used the partial nucleotide sequences of ORF2 to determine the circulating HAstV genotypes.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Specimens

The study material consisted of stool specimens collected in episodes of gastroenteritis during a trial with RRV-TV in Belém, North region of Brazil [Linhares et al., 1996] conducted from April/1990 to August/1992. This study was approved by the Ethical Review Committee of the Instituto Evandro Chagas, the Regional Council of Medicine, the Secretary of Public Health of Pará State and the Ministry of Health of Brazil as well as by the Ethical Review Committee of the World Health Organization. The trial was conducted in the outskirts of Belém, in an area of 8 km², on a population of 350,000 inhabitants living under poor sanitation and crowded conditions. Surveillance for gastroenteritis included twice-a-week visits to each child, in order to detect any diarrhea episode, defined as three or more liquid or semi-liquid motions in a 24-hr period. A total of 5,184 episodes were obtained from the 540 children who

participated in a vaccine trial in Belém and 3,075 stool samples were collected during the first 2 years of their life. In the present study, around 20% of the specimens obtained per month were randomly selected, and this resulted in a total of 624 samples, of which 293 specimens were from 164 children who had received the vaccine and 331 samples from 167 children who had received the placebo. Using EpiInfo 2000 software for assessing sample size, it could be observed that such a number would be representative of the total cohort.

Enzyme Immunoassay (EIA)

A total of 624 samples were selected and tested for astrovirus by a commercial qualitative enzyme immunoassay kit (IDEIA™ Astrovirus DakoCytomation, Ely, UK), following the recommendations of the manufacturer. Positive samples were defined as those reaching an optical density (OD) of ≥ 0.150 plus the average of the negative controls using an A₄₅₀ filter. All samples were previously screened for the presence of rotavirus and adenovirus by commercial EIA (Premier-Rotacclone™ and Adenoclone™, Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH).

RT-PCR Amplification

The viral ssRNA was extracted from fecal suspension using silica powder glass extraction as described by Boom et al. [1990], with modifications by Cardoso et al. [2002].

The RT-PCR was carried out on 129 samples, using primers Mon 269 and Mon 270. These primers targeted the ORF2 region (4526–4974 nt) and the amplification conditions were those described by Noel et al. [1995]. A random hexamer (pd [N]₆—50 A₂₆₀ units—Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) was introduced in the RT reaction to obtain the cDNA [Gabbay et al., 2005]. Briefly, RT was performed by mixing 8 μ l of viral ssRNA with 2 μ l of the random initiator, denaturation at 80°C for 8 min and ice cooling for 3 min. Thereafter, a volume of 40 μ l of the reaction mixture (4 μ l of 2.5 mM each of deoxyribonucleoside triphosphate (dNTPs) mixture, 5 μ l of tenfold concentrated reaction buffer 10 \times , 4 μ l of MgCl₂ 50 mM, 1 μ l of 10 U ribonuclease inhibitor (Amersham Pharmacia Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) 1 μ l [10 U] of Superscript™ II Rnase H Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), and 25 μ l of distilled water) was added for a final volume of 50 μ l. The cDNA was obtained after incubating the samples at 42°C for 60 min. The PCR reaction mixture was prepared for a final volume of 50 μ l, including 10 μ l of the cDNA, and 40 μ l of the mix (same volume and concentration for dNTPs and reaction buffer; 1.5 μ l of MgCl₂ 50 mM, 1.7 U/ μ l Taq DNA polymerase, Recombinant (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil), 27.15 μ l of distilled water and 1 μ l of 20 μ M each primer Mon 269 and Mon 270). PCR was conducted as described by Cardoso et al. [2002]. The RT-PCR products were then resolved on 1% agarose gel electrophoresis and were stained with ethidium

bromide. The visualization of 449 bp specific amplicon of HAstV was made in a Gel Doc 1000 (BioRad, Hercules, CA). Water was used as a negative control in all procedures and recommended manipulations for PCR techniques were strictly followed as a precaution to avoid false-positive results. A HAstV-1 strain was used as positive control.

Genotyping by PCR and Sequencing

This was accomplished with all the PCR-positive samples according to the protocol of Sakamoto et al. [2000] with modifications. The first PCR reaction was performed using the previously obtained cDNA and the same technique applied for astrovirus detection, utilizing the primers PreCAP1 and 12Gr (volume of 0.75 μ l and concentration of 33 μ M each). The second PCR was carried out with 3 μ l of the first PCR product for a final volume of reaction mixture of 25 μ l using 0.7 μ l of the primers end and 0.7 μ l of the genotype specific primer AST-S1 to AST-S8 (33 μ M each). The reaction was performed under the same concentration condition as the first amplification, except for the Taq DNA polymerase (used 1.25 U). The DNA amplification was carried out as described by Sakamoto et al. [2000]. The amplicons were resolved on 1% or 2% agarose gel electrophoresis, and visualized as described previously. The sequencing was realized as described by Gabbay et al. [2005] by using primers Mon 269 and Mon 270.

Cloning

The cDNA fragment obtained with the primers Mon 269 and Mon270, from one sample (PA-COD329-BR) of this study was cloned using the plasmidial-bacterial system. Purified amplicon was first attached to a cloning PGMT-Easy Vector[®] (Invitrogen) at lac Z a-peptide gene in order to obtain a recombinant DNA. Plasmids with the inserted viral cDNA were then transformed and amplified in *E. coli* competent bacteria (JM-109 lineage) and the plasmids were recovered using the SNAP plasmid miniprep kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). The nucleotide (nt) sequences of the cloned cDNA were determined by the dideoxy chain termination method using the sequencing ABI PRISM Dye Terminator kit

(Applied Biosystems, Foster City, CA) and resolved in an ABI 377 DNA sequencer. Universal primers designed on the basis of plasmid promoter region T7 and SP6 were used to sequence the recombinant DNA in both directions. The phylogenetic analysis was realized as described by Gabbay et al. [2005].

Nucleotide Sequence Accession Numbers

The nucleotide sequences determined in this study have been deposited in the GenBank database and assigned the accession numbers DQ917375 to DQ917407.

RESULTS

From April/1990 to August/1992, a total of 624 fecal specimens were selected and screened for HAstV by EIA, with an overall positivity rate of 4.0% (25/624). The RT-PCR was done in 129 samples: 25 HAstV-positive by EIA and 104 that showed an OD value of at least twice that of the negative control by this technique. Of these, 33 were positive by RT-PCR. Considering both EIA and RT-PCR, the positivity rate for astrovirus was 5.4% (34/624). Twenty-four samples were positive by both techniques, one was positive by EIA only and nine by PCR only. HAstV was detected in 4.8% (14/293) of the samples from the vaccinated children, and in 6% (20/331) of those receiving placebo.

All 33 RT-PCR positive samples were subjected to genotyping by Nested-PCR and sequencing. Comparing both techniques a concordance into genotype results were observed for HAstV-1 (eight samples), HAstV-2 (two samples), and HAstV-6 (one sample) (Table I). Four strains were positive for HAstV-3 by Nested-PCR, but one of this was HAstV-1 by sequencing. Similarly, four out of eight strains genotyped as HAstV-4 and two strains genotyped as HAstV-7 by Nested-PCR were genotyped by sequencing as HAstV-1 and HAstV-2, respectively (Table I). One case of mixed infection was observed by Nested-PCR, involving HAstV-2 and HAstV-4, but by sequencing only HAstV-2 could be identified (Table I). This sample (PA-COD329-BR) was also cloned using the pair of primers Mon 269 and Mon 270, being positive for HAstV-2 only. Seven (21.2%)

TABLE I. Comparison of Nested-PCR and Sequencing Methodologies for Genotyping of Human Astroviruses in 33 Samples from Belém, Pará, from April/1990 to August/1992

Nested-PCR genotyping	Sequencing genotyping					Total
	HAstV-1	HAstV-2	HAstV-3	HAstV-4	HAstV-6	
HAstV-1	8					8 (24.3%)
HAstV-2		2				2 (6.1%)
HAstV-3			3			4 (12.1%)
HAstV-4	4			4		8 (24.2%)
HAstV-6					1	1 (3.0%)
HAstV-7		2				2 (6.1%)
HAstV-2+4		1				1 (3.0%)
HAstV-NT ^a	2	4	1			7 (21.2%)
Total	15 (45.5%)	9 (27.3%)	4 (12.1%)	4 (12.1%)	1 (3.0%)	33 (100%)

^aHAstV-NT—Astrovirus not typed by nested-PCR [Sakamoto et al., 2000].

Astrovirus Genotypes in Belém

strains were not typed using the eight specific genotyping primers, however, all of them were genotyped by sequencing as HAsV-1 (two strains), HAsV-2 (four strains), and HAsV-3 (one strain) (Table I).

A phylogenetic tree based on the 348-bp fragment of the ORF2 region was constructed to study the genetic relationship between the 33 HAsV isolated in this study and other published sequences (Fig. 1). The analysis of the nucleotide sequence showed that in Belém five genotypes were circulating. Fifteen isolates (45.5%) clustered into HAsV-1, nine (27.3%) into HAsV-2, four (12.1%) into HAsV-3 and HAsV-4, and one (3.0%) into HAsV-6 (Fig. 1). The group with higher nucleotide

diversity was HAsV-2 (6.2%), followed by HAsV-1 (5.8%), HAsV-4 (4.3%), and HAsV-3 (2.3%).

All HAsV-1 strains were classified as 1a according to Medina et al. [2000] and Guix et al. [2002] (Fig. 1). Comparing these samples with the Oxford prototype (HAsV-1) of this lineage, a mean divergence of 2.5% was observed, but with the other lineages difference rates varied from 7.0% to 9.5%. The sample PA-COD379-BR was the most divergent, with an average variation of 3.5% (11 bases) in relation to lineage 1a, and averages ranging from 7.0% to 10.7% in relation to the other HAsV-1 isolates. All HAsV-2 strains were classified as 2b, based on the highest bootstrap value (99%), and the

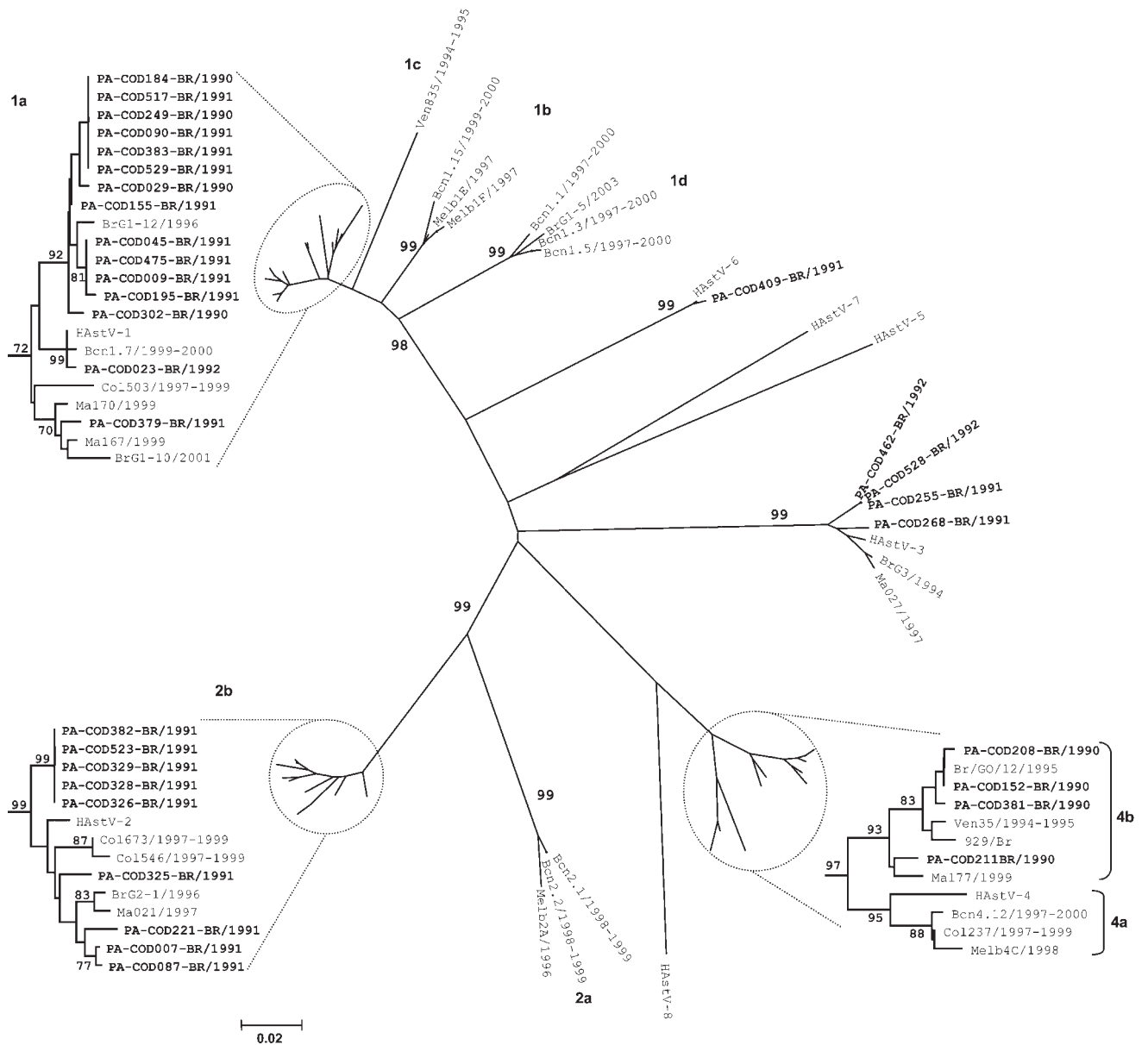


Fig. 1. Phylogenetic tree of partial region (348 bp) of astrovirus (HAsV) ORF2 capsid region in samples from 33 children from Belém-Brazil, from April/1990 to August/1992. Prototypes of the 8 HAsV genotypes were presented in the illustration, together with genotype strains from other places. The number above the branches corresponds to the bootstrap values.

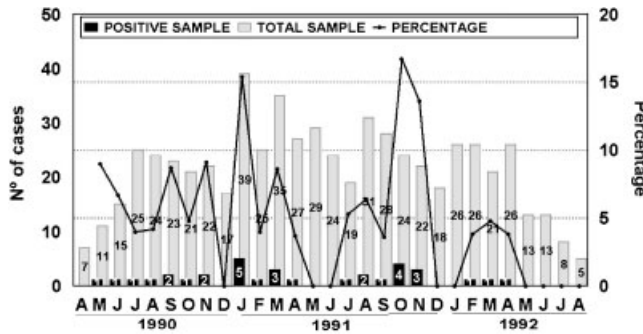


Fig. 2. Monthly distributions of 33 astrovirus strains detected in 624 stool specimens from diarrheic children, Belém, Brazil, from April/1990 to August/1992.

low divergence rate (2.3%) into this lineage (Fig. 1). The divergence observed among the two lineages of HAstV-2 was the greatest (15%). The HAstV-4 samples were classified as 4b, although mean lineage divergence values were 6.7% (Fig. 1).

Nucleotide sequence changes resulting in amino acid substitutions in relation to the prototypes was observed only in two strains: PA-COD195-BR, genotyped as HAstV-1a, contained an Asp → Val change at amino acid 186 and PA-COD208-BR genotyped as HAstV-4b contained a Val → Asp change at amino acid 183.

Figure 2 showed that the monthly distribution of astrovirus gastroenteritis occurred throughout the study period (from April/1990 to August/1992), with peak incidence rates in the months of January/91, October/91, and November/91 (15%, 17%, and 14%, respectively). The monthly frequency of each genotype is demonstrated in Figure 3. HAstV-1 was predominant during the first year of study (from May/1990 to May/

1991, with its highest rate on January/1991). HAstV-4 was detected from September to November/1990, and HAstV-2 from July to November/1991. The comparison of genotypes, according to age groups, showed that HAstV-4 was detected mostly in the age of 3–6 months, HAstV-2 in the age of 12–18 months, and HAstV-3 in the age of 18–24 months. HAstV-1 was detected in all age groups with exception of group 18–24 months (Fig. 4).

The age distribution of the astrovirus-positive cases confirmed that children of all ages were infected (Fig. 4), and cumulative incidence demonstrated that in the group aged >24 months 30.6% of the children had already been infected by HAstV (Fig. 5).

The clinical features of 34 astrovirus-related gastroenteritis cases showed that the duration of the symptoms lasted from 1 to 3 days in 50% of the cases, 4 to 6 days in 24%, and ≥7 days in 26% of the cases. Eleven (32%) children developed vomiting, three (9%) had fever of ≥38°C, and three (9%) had mild/moderate dehydration.

DISCUSSION

In this study, we took advantage of the stool sample collection obtained during a RRV-TV vaccine trial conducted in Belém, Brazil, to test some of them for the presence of HAstV.

The overall prevalence rate of HAstV infection among these children, using both EIA and RT-PCR, was 5.4%. This positivity was lower than that reported in Finland (9%), where a clinical trial with the RRV-TV vaccine had also been conducted [Pang and Vesikari, 1999]. In studies carried out in outpatient settings, HAstV infection rates were shown to be higher than ours, ranging from 6.8% in Mexico City [Walter et al., 2001] to

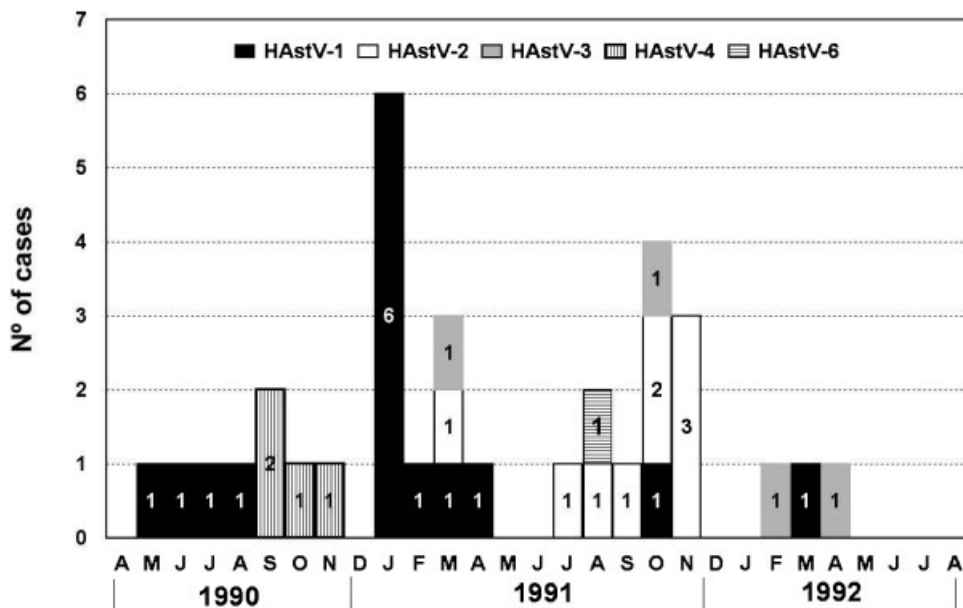


Fig. 3. Monthly distributions of astrovirus genotypes based on sequence analysis in fecal specimens from 33* diarrheic children, Belém, Brazil, April/1990 to August/1992. *One sample was not included because it was positive only by EIA.

Astrovirus Genotypes in Belém

535

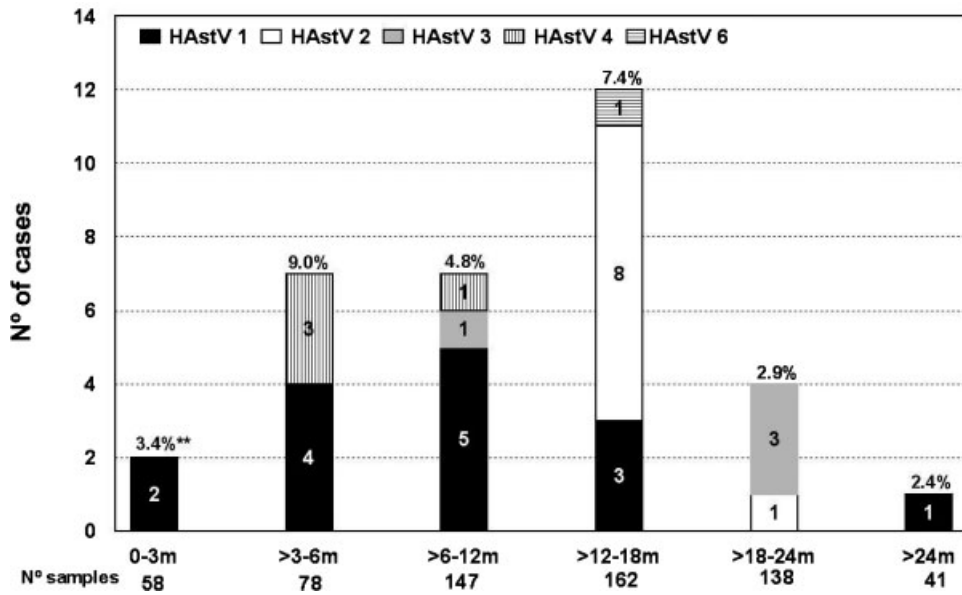


Fig. 4. Distribution of the 33* astrovirus-positive cases obtained in 624 fecal specimens from diarrheic children, by age and genotypes. Belém, Brazil, April/1990 to August/1992. *One sample was not included because it was positive only by EIA. **Overall percentage for the age group.

17% in Rural Mayan [Maldonado et al., 1998]. In Brazil, most of the studies were conducted in public hospitals, including surveys in Goiás [Cardoso et al., 2002], São Paulo [Timenetsky et al., 1993], and Rio de Janeiro [Leite et al., 1991], which yielded prevalence rates of 3–5%, which were similar to those reported in Belém. Of note, in Maranhão, Brazil [Gabbay et al., 2005], a prevalence rate of 11% among diarrheic children was recorded being higher than that yielded in our study. Since the same methodology was used in both studies, difference in prevalence rates are likely to be attributable to demographic conditions or even the number of samples gathered in compared studies.

The use of combined techniques, EIA, and RT-PCR, enhanced the HAstV detection. EIA appears to be very useful for the screening of fecal samples, but RT-PCR seems to be more sensitive as demonstrated [Walter and Mitchell, 2000; Dalton et al., 2002; Espul et al., 2004].

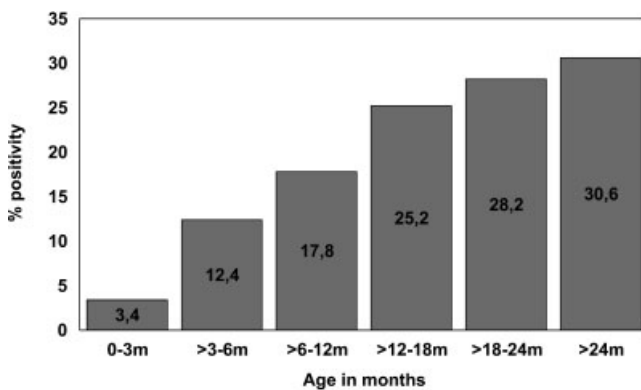


Fig. 5. Cumulative incidence of astrovirus infection by age in 34 positive cases, detected in diarrheic children from Belém, Brazil, April/1990 to August/1992.

Indeed, in our study, 26.5% of HAstV-positive samples were detected by RT-PCR only. This technique was applied to 129 samples that were HAstV-positive by EIA or that yielded an OD value of at least twice that of the negative control.

All HAstV-positive samples were tested by the type-specific RT-PCR [Sakamoto et al., 2000] and sequencing analysis (ORF2) [Noel et al., 1995]. The concordance observed between these two techniques was 69.2%, suggesting that failure of RT-PCR typing could have been due either to mismatching, low RNA yield or possible cross-reactions involving some genotypes, mainly HAstV-4 and HAstV-7 [Matsui et al., 1998]. Studies conducted in a periurban community of Mexico City [Walter et al., 2001] and in Hungary [Jakab et al., 2004] have also utilized these two methodologies and demonstrated a good correlation in the results obtained; however, they used a different set of primers for typing by RT-PCR.

Seven samples were only genotyped by sequencing even though they had been tested individually with each of the eight genotyping primers. The primers Mon 269 and Mon 270 used for sequencing these strains annealed to a conserved region while the primers used in PCR-genotyping annealed to a variable region. This may have influenced on the results obtained in the PCR-genotyping. It is worth mentioning the case of sample PA-COD329-BR that, by PCR-genotyping showed a mixed infection involving HAstV-2 and HAstV-4, and by sequencing HAstV-2 only. To confirm this result this sample was also cloned and only HAstV-2 was detected.

Five HAstV types co-circulated in Belém during the study period and HAstV-1 was the most prevalent genotype. This observation is in agreement with

previous studies conducted in different countries of the world, including Brazil [Cardoso et al., 2002; Dalton et al., 2002; Guix et al., 2002; Espul et al., 2004]. In a study conducted in a periurban community of Mexico City, HAstV-2 was found to be the most prevalent [Walter et al., 2001]. In Belém, Brazil, HAstV-2 was considered the second most common genotype by sequencing, similarly to what had been detected in Madrid, Spain [Dalton et al., 2002]. The genotypic complexity of co-circulating strains observed in Belém, has also been reported elsewhere in the world, including Brazil [Naficy et al., 2000; Nadan et al., 2003; Gabbay et al., 2005; Silva et al., 2006].

In light of observations made by some authors [Medina et al., 2000; Guix et al., 2002], HAstV-1 was classified into four lineages (1a to 1d). All HAstV-1 samples from Belém, Brazil were included into 1a lineage, contrasting with the observations of Medina et al. [2000], with strains from Colombia and Venezuela, which were classified into three different lineages (1a, 1b, and 1c). The HAstV-1a samples from Belém, Brazil, were also found in other settings included samples collected in the Amazon region (Col503-Colombia), in the Northeast region (Ma170-São Luís, Maranhão) and West Central region (BrG1-12-Brasília, DF, BrG1-10-Goiânia, Goiás) of Brazil [Medina et al., 2000; Gabbay et al., 2005; Silva et al., 2006]. A sample from Barcelona [Guix et al., 2002] and the HAstV-1 prototype were also included in the HAstV-1a lineage. All samples included in the HAstV-1a tree were collected in the period of 1996–2001, as well as those from Belém, Brazil during 1990–1992. This suggests that strains of such a lineage were circulating for a large length of time.

All samples classified as either HAstV-2 or HAstV-4 belonged to lineages 2b and 4b, respectively. The first type also clustered with samples from Colombia, Brazil (Brasília and São Luís), and the second with strains from Venezuela, Brazil (Brasília, Rio de Janeiro and São Luís) [Medina et al., 2000; Gabbay et al., 2005; Silva et al., 2006; GeneBank AY846635]. With exception of two samples (PA-COD195-BR and PA-COD208-BR), of which the nucleotide sequence changes resulted in amino acid substitutions, the remainder of nucleotide sequence changes, as compared to the prototype, were all synonymous change.

The incidence of HAstV infection peaked twice throughout our study (January/91 and October/91) but low numbers prevent us from drawing firm conclusions on seasonality. The temperature and humidity registered in these 2 months did not differ significantly, but in relation to the rainfall index it was higher in January/91 (392 mm³) than in October/91 (157 mm³). The HAstVs were also detected in another study conducted in the West Central region of Brazil during the period of October–December/98, which corresponds to spring and early summer in this region [Cardoso et al., 2002].

The results obtained in Barcelona, Spain, by Guix et al. [2002] showed an increasing incidence of HAstV-1 during the 3 years of this study, differing from the findings in Belém, where this type prevailed in the first

year (May/1990 to April/1991). In our study, HAstV-2 infections clustered from July to November/1991. This temporal distribution pattern differs from that observed by Walter and Mitchell [2000] in a periurban community of Mexico City, where HAstV-2 was detected throughout the entire 2 years study period.

The pattern of age distribution in our study was similar to those observed in Barcelona, Spain, by Guix et al. [2002], except for HAstV-4, which was more often detected among children older than 3 years. In our study, the highest peaks of detection rate was observed in children aged >3 to 6 (9.0%) and >12 to 18 (7.4%) months of age. These results agree with those from Giordano et al. [2004] in Cordoba, Argentina, who reported a higher positivity rate in these two groups. However, our results differ from those of Barcelona, Spain [Guix et al., 2002], where the peak incidence was observed among older children, aged 2–4 years (9%). In a study conducted in Goiás, Brazil [Cardoso et al., 2002], the overall percentage obtained in children less than 2 years of age was lower, when compared to that for our study. In contrast, in Maranhão, Brazil [Gabbay et al., 2005], the results were similar, as the peak incidence was higher in the age group of 0–6 months (18%). It should be pointed out that 30.6% of the children from Belém had already been infected by HAstV at the age of 24 months.

HAstV infection in Belém was in general associated with diarrhea and vomiting (32%) but less often with fever and dehydration (9% each). These findings are similar to those from other community-based studies conducted worldwide [Guerrero et al., 1998; Maldonado et al., 1998].

In comparing the duration of diarrhea with HAstV genotypes, HAstV-4 was associated with a duration (≥ 7 days) longer than that of HAstV-2. Unlike our observation, Walter and Mitchell [2000] in Mexico City had shown that HAstV-2-related episodes lasted longer than those by HAstV-4, but this may have occurred by chance, since we examined a low number of samples.

Of note, the only HAstV-6 infection detected in Belém was clinically severe, since diarrhea episode lasted for more than 7 days, with vomiting (≥ 3 episodes), fever ($\geq 38^\circ\text{C}$) and moderate dehydration. However, conclusions cannot be drawn as a more severe clinical outcome was associated to this specific genotype, based on observations from a single HAstV-6 isolate.

Co-infection involving HAstV and other pathogens (rotavirus, bacteria, and parasites) was not observed in Belém, as it was described elsewhere, including Brazil [Pang and Vesikari, 1999; Guix et al., 2002; Méndez-Toss et al., 2004; Gabbay et al., 2005].

The anti-rotavirus RRV-TV vaccine caused no effect on HAstV gastroenteritis incidence in Belém study, similarly to what has been reported by Pang and Vesikari [1999]. The number of fecal specimens tested in the vaccine group (293 samples) was similar to the placebo group (331 samples), and no statistically significant difference was observed as to HAstV positivity rate (4.8% and 6.0%, respectively).

Astrovirus Genotypes in Belém

537

In summary, our data shows that HAstV accounts for 5.4% of infantile gastroenteritis cases in Belém, Brazil and underscores the importance of HAstV as a potential viral enteropathogen. HAstV-1 was found to predominate in this study but HAstV-2, HAstV-3, HAstV-4, and HAstV-6 were also circulating, though at lower rates. Our findings provide the first epidemiological and molecular information on the HAstV circulation in the Northern Region of Brazil and may be of great importance regarding possible future strategies toward the development of HAstV vaccines. Studies dealing with HAstV infection are of growing importance in view of the recent introduction of rotavirus vaccines in several countries, including Brazil (Linhares and Villa, 2006).

Accession Numbers

The eight prototype sequences used were: HAstV1 (L23513), HAstV2 (L13745), HAstV3 (L38505), HAstV4 (L38506), HAstV5 (U15136), HAstV6 (L38507), HAstV7 (L38508), and HAstV-8 (Z66541). Other strains obtained in GeneBank were used for comparison: BrG1-12 (DQ139826), Bcn1.7 (AF348759), Col503 (AF211964), MA170/BR/99 (DQ071654), MA167/BR/99 (DQ071652), BrG1-10 (DQ139828), Ven835 (AF211956), Bcn1.15 (AF348767), Melb1E (AF175253), Melb1F (AF175254), Bcn1.1 (AF348753), BrG1-5 (DQ139825), Bcn1.3 (AF348755), Bcn1.5 (AF348757), BrG3 (DQ139831), MA027BR/97 (DQ071649), GO/12/95/BR (DQ070852), Ven35 (AF211952), 929/BR (AY846635), MA177/BR/99 (DQ071655), Bcn4.12 (AF348795), Col237 (AF211957), Melb4C (AF175259), Bcn2.1 (AF348771), Bcn2.2 (AF348772), Melb2A (AF175260), Col673 (AF211959), Col546 (AF211961), BrG2-1 (DQ139830), and MA021/BR/97 (DQ071648).

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the valuable technical support provided by Dr. Olinda Macêdo, Dr. Ivete V. Costa, Antonia Alves, Maria Silvia de Lucena and Antônio de Moura. Thanks are also due to the field staff and doctors that worked during the RRV-TV rotavirus vaccine trial. Luciana Damascena da Silva, Elielma L. Cavalcante-Pepino and Lilianny S. Nakamura received a grant fellowship from the National Council for the Development of Science and Technology, Brasília, Federal District, Brazil (CNPq). This study received financial support from SECTAM/FUNTEC/PA, IEC/SVS/MS, IOC/FIOCRUZ, and CNPq.

REFERENCES

- Appleton H, Higgins PG. 1975. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* 1:1297.
- Belliot G, Laveran H, Monroe SS. 1997. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *J Med Virol* 51:101–106.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495–503.
- Cardoso DDP, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Martins RMB, Leite JPG. 2002. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiânia, Goiás, Brazil. *Med Sci Monit* 8:CR624–CR628.
- Clark B, McKendrick M. 2003. A review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis* 241–246.
- Cunliffe NA, Dove W, Gondwe JS, Thindwa BD, Greensill J, Holmes JL, Brees JS, Monroe SS, Glass RI, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. 2002. Detection and characterization of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol* 67:563–566.
- Dalton RM, Roman ER, Negredo AA, Wilhelmi ID, Glass RI, Sánchez-Fauquier A. 2002. Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. *Pediatr Infect Dis J* 21:1038–1041.
- Espul A, Martinez N, Noel JS, Cuella H, Abrile C, Grucci S, Glass R, Berke T, Matson DO. 2004. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *J Med Virol* 72:75–82.
- Gabbay YB, Luz CRNE, Costa IV, Cavalcante-Pepino EL, Sousa MS, Oliveira KK, Wanzeller ALM, Mascarenhas JDP, Leite JPG, Linhares AC. 2005. Prevalence and genetic diversity of astroviruses in children with and without diarrhea in São Luís, Maranhão, Brazil. *Men Inst Oswaldo Cruz* 100:709–714.
- Giordano MO, Martinez LC, Isa MB, Paez Rearte M, Nates SV. 2004. Childhood astrovirus-associated diarrhea in the ambulatory setting in a public hospital in Cordoba city, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 46:93–96.
- Glass RI, Noel JS, Mitchell D, Herrmann JE, Blacklow NR, Pickering LK, Dennehy P, Ruiz-Palacios G, De Guerreiro ML, Monroe SS. 1996. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: A review. *Arch Virol* 12:287–300.
- Guerrero ML, Noel JS, Mitchell DK, Calva JJ, Morrow AL, Martinez J, Rosales G, Velazquez FR, Monroe SS, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. 1998. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr Infect Dis* 17:723–727.
- Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolome R, Latorre C, Rabella N, Simo M, Bosch A, Pinto M. 2002. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol* 40:133–139.
- Herrmann JE, Taylor DN, Echeverria P, Blacklow NR. 1991. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N Engl J Med* 324:1757–1760.
- Jakab F, Meleg E, Bányai K, Meleg B, Tímár L, Péterfai J, Szűcs G. 2004. One-year survey of astrovirus infection in children with gastroenteritis in a large hospital in Hungary: Occurrence and genetic analysis of astroviruses. *J Med Virol* 74:71–77.
- Lee TW, Kurtz JB. 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976–1992, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol Infect* 112:187–193.
- Leite JPG, Barth OM, Schatzmayr HG. 1991. Astrovirus in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86:489–490.
- Lew JF, Moe CL, Monroe SS, Allen JR, Harrison BM, Forrester BD, Stine SE, Woods PA, Hierholzer JC, Herrmann JE, Blacklow NR, Bartlett AV, Glass RI. 1991. Astrovirus and adenovirus associated with diarrhea in children in day care settings. *J Infect Dis* 164:673–678.
- Linhares AC, Villa LL. 2006. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). *J Pediatr* 82:525–534.
- Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JDP, Freitas RB, Oliveira CS, Belles N, Monteiro TAF, Lins-Laison Z, Ramos FLP, Valente SA. 1996. Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil. *Bull World Health Org* 74:491–500.
- Madeley CR, Cosgrove BP. 1975. 28-nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2:451–452.
- Maldonado Y, Cantwell M, Old M, Hill D, Sanchez ML, Logan L, Millan-Velasco F, Valdespino JL, Sepulveda J, Matsui S. 1998. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *J Infect Dis* 178:334–339.
- Matsui SM, Greenberg HB. 2001. Astroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*, 4th edition. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins. pp 875–893.

- Matsui M, Ushijima H, Hachiya M, Kakizawa J, Wen L, Oseto M, Morooka K, Kurtz JB. 1998. Determination of serotypes of astrovirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiol Immunol* 42:539–547.
- Medina SM, Gutierrez MF, Liprandi F, Ludert JE. 2000. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. *J Clin Microbiol* 38:3481–3483.
- Méndez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, Guiscafre H, Cedillo R, Munoz O, Herrera I, Lopez S, Arias CF. 2004. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J Clin Microbiol* 42:151–157.
- Mitchell DK, Madson DO, Jiang X, Berke T, Monroe SS, Carter MJ, Willcocks MM, Pickering LK. 1999. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J Infect Dis* 180:514–517.
- Mustafa H, Palombo EA, Bishop RF. 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J Clin Microbiol* 38:1058–1062.
- Nadan S, Walter JE, Grabow WOK, Mitchell DK, Taylor MB. 2003. Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: Comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. *Appl Environ Microbiol* 69:747–753.
- Naficy AB, Rao MR, Holmes JL, Abu-Elyazeed R, Savarino SJ, Wierzb TF, Frenck RW, Monroe SS, Glass RI, Clemens JD. 2000. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. *J Infect Dis* 182:685–690.
- Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 33:797–801.
- Pang XL, Vesikari T. 1999. Human astrovirus-associated gastroenteritis in children under 2 years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Acta Paediatr* 88:532–536.
- Polombo EA, Bishop RF. 1996. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J Clin Microbiol* 34:1750–1753.
- Rodriguez-Baez N, O'Brien R, Qiu SQ, Blass DM. 2002. Astrovirus, adenovirus, and rotavirus in hospitalized children: Prevalence and association with gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35:64–68.
- Sakamoto T, Negidhi H, Wang QH, Akihara S, Kim B, Nishimura S, Kaneshi K, Nakaya S, Ueda Y, Sugita K, Motohiro T, Nishimura T, Ushijima H. 2000. 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* 61:326–331.
- Schnagl RD, Belfrage K, Farrington R, Hutchinson K, Lewis V, Erlich J, Morey F. 2002. Incidence of human astrovirus in Central Australia (1995 to 1998) and comparison of deduced serotypes detected from 1981 to 1998. *J Clin Microbiol* 40:4114–4120.
- Silva AM, Leite EG, Assis RM, Majerowicz S, Leite JPG. 2001. An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 in a day care center in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:1069–1073.
- Silva PA, Cardoso DDP, Schreier E. 2006. Molecular characterization of human astroviruses isolated in Brazil, including the complete sequences of astrovirus genotypes 4 and 5. *Arch Virol* 151:1405–1417.
- Taylor MB, Walter J, Berke T, Cubitt WD, Mitchell DK, Matson DO. 2001. Characterization of a South African human astrovirus as type 8 by antigenic and genetic analyses. *J Med Virol* 64:256–261.
- Timenetsky MCST, Kisielius JJ, Grisi SJFE, Escobar AMU, Ueda M, Tanaka H. 1993. Rotavírus, adenovírus, astrovírus, calicivírus e “small round vírus particles” em fezes de crianças, com e sem diarreia aguda, no período de 1987 a 1988, na grande São Paulo. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 35:275–280.
- Unicomb LE, Banu NN, Azim T, Islam A, Bardhan PK, Faruque ASG, Hall A, Moe CL, Noel JS, Monroe SS, Albert MJ, Glass RI. 1998. Astrovirus infection in association with acute, persistent and nosocomial diarrhea in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J* 17:611–614.
- Walter JE, Mitchell DK. 2000. Role of astroviruses in childhood diarrhea. *Curr Opin Pediatr* 12:275–279.
- Walter JE, Mitchell DK, Guerreiro ML, Berke T, Madison DO, Monroe SS, Pickering LK, Ruiz-Palacios G. 2001. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico City. *J Infect Dis* 183:681–683.

APÊNDICE B:

GABBAY YB, LUZ CRNE, COSTA IV, CAVALCANTE-PEPINO EL, SOUSA MS, OLIVEIRA KK, WANZELLER ALM, MASCARENHAS JDP, LEITE JPG. Prevalence and genetic diversity of astroviruses in children with and without diarrhea in São Luís, Maranhão, Brazil. Publicado na revista *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 7, p. 709-714, 2005.

Prevalence and genetic diversity of astroviruses in children with and without diarrhea in São Luís, Maranhão, Brazil

Yvone B Gabbay/⁺, Cláudia Regina NE da Luz*, Ivete V Costa, Eielma L Cavalcante-Pepino, Maisa S Sousa, Krynssya K Oliveira, Ana Lucia Monteiro Wanzeller, Joana D'Arc P Mascarenhas, José Paulo G Leite** , Alexandre C Linhares

Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, BR 316 Km 07, s/nº, 67030-000 Ananindeua, PA, Brasil *Hospital Universitário Materno Infantil, São Luís, MA, Brasil **Laboratório de Virologia Comparada, Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Human astroviruses (HAstV) have been increasingly identified as important etiological agents of acute gastroenteritis in children up to five years old. The aim of this study was to determine the prevalence and genotype diversity of HAstV in children with symptomatic and asymptomatic infections in São Luís, Maranhão, Brazil. From June 1997 to July 1999 a total of 183 fecal samples 84 from symptomatic and 99 from asymptomatic children were tested by enzyme immunoassay for HAstV. Prevalence rates were found to be 11 and 3% for symptomatic and asymptomatic children, respectively. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out in 46 specimens (26 symptomatic and 20 asymptomatic) including the 12 samples that were positive by enzyme immunoassay (EIA). The overall positivity yielded by both methods was 8% (15/184); of these, 11% (9/84) for symptomatic and 5% (5/99) for those without symptoms or signs. Sequence analysis of amplicons revealed that HAstV-1 genotype was the most prevalent, accounting for 60% of isolates. Genotypes 2, 3, 4, and 5 were also detected, as one single isolate (10%) for each type. Variations in the sequences were observed when Brazilian isolates were compared to prototype strains identified in the United Kingdom. No seasonal pattern of occurrence was observed during these two years of study, and peak detection rate was observed in children aged between 3 and 6 months in the symptomatic group, and between 18 and 24 months in the controls.

Key words: human astroviruses (HAstV) - diarrhea - children - São Luís, Maranhão - Brazil

Human astroviruses (HAstVs) are members of the *Astroviridae* family which are recognized as one of the most common cause of viral gastroenteritis in infants and young children (Glass et al. 1996).

HAstV derive their name from a morphologically characteristic five- or six point star shape they display when visualized by electron microscopy (EM) (Appleton & Higgins 1975, Madeley 1995). The HAstV virion is composed of a single non-enveloped capsid layer of 27 to 34 nm in diameter (Matsui & Greenberg 2001). The genome consists of a single-stranded (ss), positive sense, polyadenylated RNA with 6.8-7.8 kilobases in length. Three open reading frames (ORFs) have been identified: ORF1a and ORF1b, which encode viral protease and polymerase, respectively; and ORF2, which encodes the capsid protein precursor (Willcocks et al. 1994, Jiang et al. 1993).

HAstVs are classified into eight genotypes based on the nucleotide sequence of a 348-bp region of ORF2 that have shown a good correlation with the eight established serotypes (Appleton & Higgins 1975, Noel et al. 1995, Matsui & Greenberg 2001). Typing surveys have shown

that type 1 is the most prevalent, followed by types 2, 3, 4, and 5 (Lee & Kurtz 1994, Glass et al. 1996, Mustafa et al. 2000, Sakamoto et al. 2000).

Usually HAstVs infect young children, however, outbreaks of diarrhea involving elderly people, military recruits and immunocompromised patients have been reported (Grohmann 1993, Glass et al. 1996, Belliot et al. 1997). The main symptom of infection caused by HAstV is watery diarrhea, which is often associated with vomiting, fever, anorexia, and abdominal pain (Matsui & Greenberg 2001).

Reports on HAstV infection have already been described in different cities of Brazil, showing that HAstV prevalence rates range between 2.8 and 33%. These studies focused on surveillance for gastroenteritis in hospitals and day-care centers, as well as on self-limited outbreaks (Leite et al. 1991, Timenetsky et al. 1993, Tanaka et al. 1994, Silva et al. 2001, Cardoso et al. 2002).

The main purpose of this report is to provide epidemiological and clinical data on the occurrence of HAstV infection among diarrheic and non-diarrheic children aged up to two years, living in São Luís, Maranhão, Northeast region of Brazil. We have also analyzed the partial nucleotide sequences of ORF2 region to determine the prevalence of HAstV genotypes.

MATERIALS AND METHODS

Study subjects - From June 1997 to July 1999 a hospital-based surveillance was conducted at the Infante

Financial support: IEC/SVS, IOC-Fiocruz, Funtec-PA, Pibic/CNPq

⁺Corresponding author. E-mail: yvonegabbay@iec.pa.gov.br

Received 2 June 2005

Accepted 26 October 2005

710 Astrovirus infection in São Luís, Brazil • Yvone B Gabbay et al.

Maternal University Hospital from Federal University of Maranhão (HUMI/UFMA), including children under two years of age, both sexes, who lived under poor sanitation conditions in the central area of São Luís, Maranhão, a city located in the Northeast region of Brazil.

Stool specimens - At enrollment an informed consent was obtained from either parents or guardians of participating children, and a complete standardized questionnaire designed to gathering main clinical and epidemiological data was completed by a pediatrician. Diarrheic children (symptomatic) were defined as those subjects who developed diarrhea, defined as the passage of ≥ 3 looser than normal stools in a 24 h period, lasted no longer than 14 days, and coursed with dehydration. A group of children who attended an outpatient pediatric clinic of HUMI/UFMA, without diarrhea, were enrolled as controls (asymptomatic). Of 245 fecal specimens obtained during the surveillance study, 183 samples had a sufficient quantity to be tested for HAstV 84 from children with diarrhea and 99 from those without diarrhea. These samples were stored at -20°C until they were sent to the Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, where they were processed.

Enzyme immunoassay (EIA) - All 183 samples were screened for the presence of HAstV antigen by a commercial HAstV EIA kit (IDEIA™, DakoCytomation, Ely, UK). These samples were also tested for the presence of rotavirus (RV) and adenovirus (AdV) by commercially available EIAs (Premier-Rotaclone™ and Adenoclone™, Meridian Bioscience Inc., US).

Electron microscopy (EM) - Briefly, a 10% fecal suspension was made in water and clarified by low-speed centrifugation ($1500 \times g$ for 15 min). The supernatants were collected and centrifuged at $14,000 \times g$ for 40 min. The resulting pellets were resuspended in 50 μl of water and 10 μl were placed on a carbon-formvar-coated copper grid. Staining was done with potassium phosphotungstic acid pH 7.0. Samples were examined under a Zeiss EM 900 transmission electron microscope.

RNA extraction and amplification assays - Viral ssRNA was extracted from 200 μl of a 10% fecal suspension using silica/guanidine thiocyanate, as described by Boom et al. (1990), including modifications introduced by Cardoso et al. (2002).

RT-PCR for HAstV was carried out in 44 samples using primers (Mon 269 and Mon 270) directed towards the ORF2 region, and the amplification conditions were those as described by Noel et al. (1995), except for the RT reaction where a random initiator [hexamer pd (N)₆ - 50 A₂₆₀ units - Amersham Biosciences] was utilized to obtain the cDNA product. RT-PCR products were resolved on a 1% agarose gel, followed of ethidium bromide staining and photo-documentation was done in a Gel Doc 1000 (BioRad). Samples showing a specific amplicon of 449 bp were considered as positive.

Water was used as a negative control in all procedures and recommended manipulations for PCR techniques were strictly followed as a precaution to avoid false-positive results. A HAstV-1 strain, kindly donated

by Dr Roger Glass, CDC, Atlanta, was used as a positive control.

Sequencing of RT-PCR astrovirus amplicons - The amplicons were purified with Concert™ Rapid PCR Purification System (Invitrogen), in accordance with the manufacturer's instructions. The nucleotide sequence was determined by direct cycle sequencing using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) and the primers Mon 269 and Mon 270. The purification of the amplicon was done by isopropanol/ethanol (75/70%) precipitation. The products were analyzed on an automatic ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Sequence data from both strands were aligned and edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor (v. 6.0) program and compared with eight prototype sequences: HAstV1 (L23513), HAstV2 (L13745), HAstV3 (L38505), HAstV4 (L38506), HAstV5 (U15136), HAstV6 (L38507), and HAstV7 (L38508), Oxford reference strains and HAstV-8 (Z66541), United Kingdom reference, obtained from GenBank at the National Center for Biotechnology Information, US (www.ncbi.nlm.nih.gov), using the BLAST program. The dendrogram was constructed by neighbor-joining method using the Mega (v. 3.0) software, supported by bootstrap using 1000 replicates.

Nucleotide sequence accession numbers - The nucleotide sequences determined in this study have been deposited in the GenBank database and assigned the accession numbers from DQ071648 to DQ071656.

RESULTS

From a total of 183 samples analyzed by the EIA, 9/84 (11%) from diarrheic children and 3/99 (3%) from non-diarrheic children were positive for HAstV ($p = 0.072$). RT-PCR was carried out in 46 specimens (12 which reacted HAstV-positive by EIA and 34 showing an optical density value of at least twice that of the negative control). Taking both methodologies together (EIA and RT-PCR), 14 (8%) out of the 183 samples [9/84 (11%) from diarrheic and 5/99 (5%) from non-diarrheic] were positive for HAstVs (Table I). Four samples were positive by EIA only, after being tested at least twice. In addition, two of them were confirmed as positive by EM, where particles with typical morphology of HAstV were visualized.

TABLE I

Detection of human astrovirus by enzyme immunoassay (EIA) and reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) in fecal specimens from 183 children, São Luís, Maranhão, September 1997 to July 1999

	Diarrheic (84) ^a		Non-diarrheic (99) ^a	
	RT-PCR (%)	RT-PCR (%)	RT-PCR (%)	RT-PCR (%)
EIA				
Positive	7 (8)	2 (3)	1 (1)	2 (2)
Negative	-	75 (89)	2 (2)	94 (95)

a: number of fecal specimens tested.

Mixed infection was observed in five diarrheic HAstV-positive children: three of whom were also excreting RV, one was enteric AdV-positive, and a third patient was found to be also positive for both RV and non-enteric AdV. A mixed infection involving HAstV and RV was also identified in a non-diarrheic child (data not shown).

Nucleotide sequence data were obtained from nine out of ten RT-PCR-positive samples. All HAstV-1 strains were gathered in the period of March-July 1999. A phylogenetic tree from analysis of a 348 bp region of the capsid is shown in Fig. 1. It can be seen that all HAstV-1 strains were clustered into one major lineage containing a number of minor branches. Four HAstV strains were clustered with HAstV-2, 3, 4, and 5 strains. All major branches demonstrated a 100% bootstrap confidence level. According to the segregation of the nucleotide and deduced amino acid sequences, the five HAstV genotypes demonstrated divergences that ranged from 22.1 to 28.8% and from 3.1 to 10%, respectively (data not shown).

Variation in the nucleotide sequence, but not in the amino acid sequence, was more evident between the São Luís isolates and the prototype strains used in the phylogenetic analysis (Fig. 1). In general, limited nucleotide variation was observed in the São Luís genotype 1 isolates, which displayed a maximum of 0.9% nucleotide sequence diversity. The variation between these samples and the prototype HAstV-1 reached a maximum of 2.4%. All the nucleotide sequence changes within the São Luís

HAstV-1 strains were silent with respect to amino acid coding, except for one specimen (MA167) (data not shown). This sample contained a Lys → Arg change at amino acid 56 of the capsid protein (0.9% of diversity). São Luís HAstV-2, 3, 4, and 5 strains displayed a variation in their nucleotide sequence, in comparison with their prototypes, of 2.3, 2.4, 6.3, and 4.4%, respectively. In considering the amino acid sequence, the variations found among the four types, in comparison with their corresponding prototypes were 0.0, 0.9, 0.9, and 1.7%, respectively.

Seasonal pattern of occurrence was not observed over the two years of survey, with positive cases being detected in the months of September-December 1997, October 1998, and March-June 1999 (Fig. 2A). In the non-diarrheic children HAstV was found in October 1997, May and November 1998, and June and July 1999, with one positive sample per month (Fig. 2B).

The age distribution of HAstV infection is shown in Table II. The peak detection rate was observed in 18% of the symptomatic children aged 0 to 6 months old, and 18 to 24 months old (25%) for the non-diarrheic patients. The main symptoms observed in the nine HAstV-positive diarrheic patients were fever and vomiting (89%) (Table III).

DISCUSSION

This study describes the prevalence and genotype distribution of HAstV infections in sporadic cases of in-

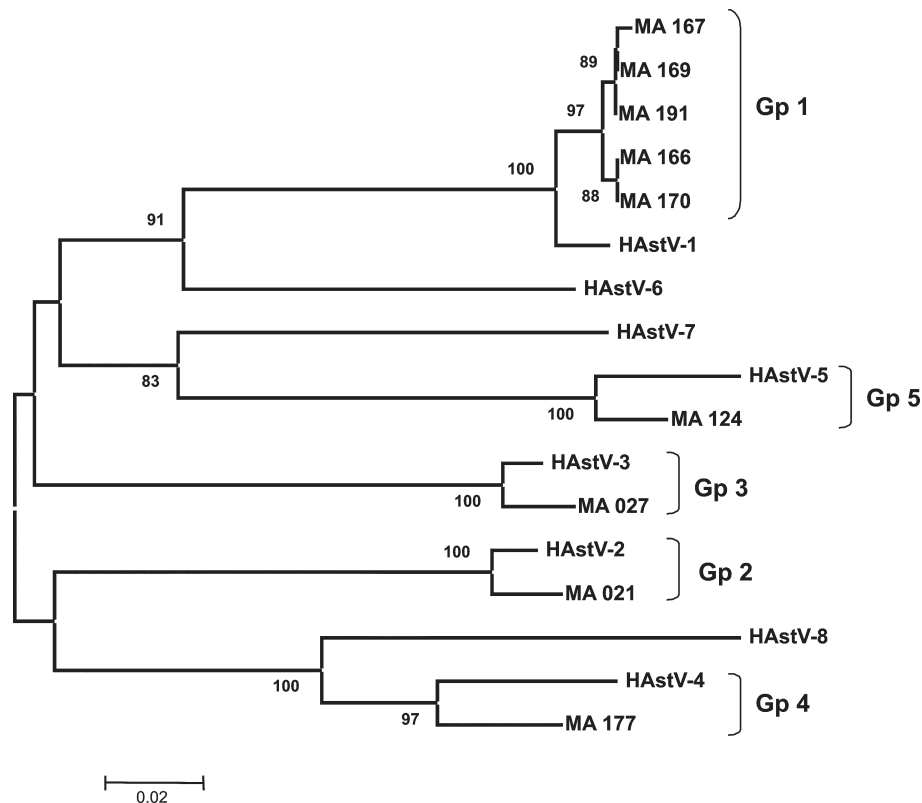


Fig. 1: phylogenetic tree of a 348-bp ORF2 region of human astrovirus (HAstV) strains from São Luís, Maranhão, from June 1997 to July 1999 and standard HAstV strains (HAstV-1 to HAstV-8) isolated in the United Kingdom. The scale bar represents a genetic distance of 2%. The sequences were obtained from the GenBank database with the accession numbers listed in Materials and Methods.

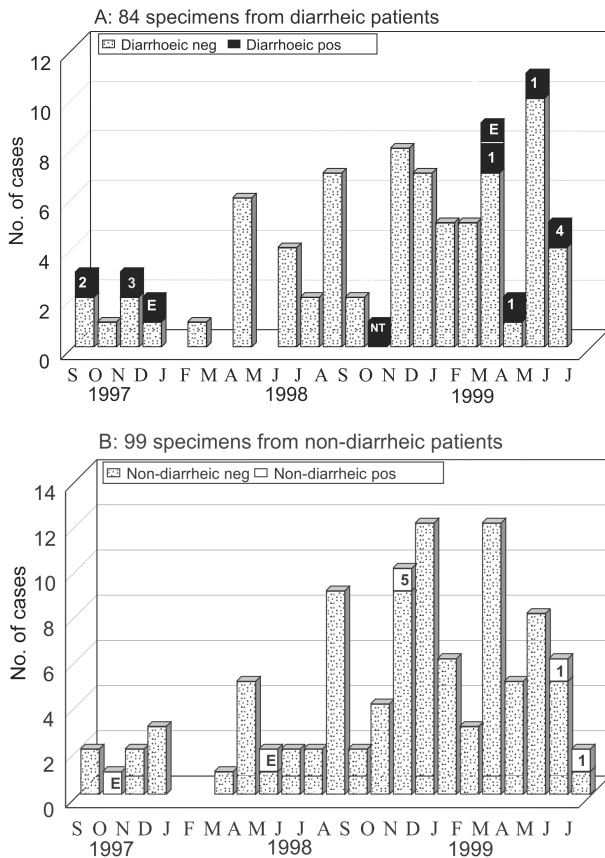


Fig. 2: temporal distribution and human astrovirus (HAstV) genotypes detected in faecal specimens from 183 children, São Luís, Maranhão, from September 1997 to July 1999. 1, 2, 3, 4, and 5: types of astrovirus detected during the study; E: ELISA positive and PCR negative; NT: not typed

TABLE II

Frequency of human astrovirus (HAstV), according to age, in children from São Luís, Maranhão, June 1997 to July 1999

Age (months)	Diarrheic	Non-diarrheic
	HAstV/Total (%)	HAstV/Total (%)
0- 6	2/11 (18)	1/12 (8)
> 6- 12	4/48 (8)	2/56 (4)
>12- 18	2/18 (11)	0/23
>18- 24	1/7 (14)	2/8 (25)
Total	9/84 (11)	5/99 (5)

fantile gastroenteritis in São Luís, Maranhão, Brazil, from September 1997 to July 1999. The HAstV prevalence rate found among the diarrheic children (11%) was similar to that observed in Madrid, Spain (Dalton et al. 2002), but lower than that for Chilean children (16%) (Gaggero et al. 1998). Our data showed rates higher than those reported previously (4-5%) for other countries; for instance, Melbourne, Central Australia, Barcelona, Mexico, and Bangladesh (Polombo et al. 1996, Unicom et al. 1998, Guix et al. 2002, Schnagl et al. 2002, Mendez-Toss et al.

TABLE III

Clinical symptoms observed in diarrheic children with human astrovirus (HAstV) infection, São Luís, Maranhão, June 1997 to July 1999

Symptoms	HAstV positive ^a (n = 9) (%)
Vomiting	8 (89)
Fever	8 (89)
Anorexia	7 (78)
Abdominal pain	6 (67)
Mild dehydration	4 (44)
Moderate dehydration	5 (56)
Severe dehydration	-

^a: mixed infection was observed in five cases: three with rotavirus (RV) one with enteric adenovirus (AdV) and one with both RV and AdV.

2004). With regards to the prevalence of HAstV infection in Brazil, studies conducted in a public hospital in Goiânia, Goiás (Cardoso et al. 2002), São Paulo (Timenetsky et al. 1993), and Rio de Janeiro (Leite et al. 1991) yielded prevalence rates of 3-5%, which were lower than those reported for São Luís. The prevalence of HAstV infection among non-diarrheic children (5%) was similar to those previously reported in various countries such as Mexico (3%), Bangladesh (2%), South Africa (2%), Guatemala (2%), and Thailand (2%) (Herrmann et al. 1991, Cruz et al. 1992, Steele et al. 1998, Unicom et al. 1998, Méndez-Toss et al. 2004).

Of note, co-infection involving HAstV and RV were detected in 36% of our samples, a rate which is greater than that of 17% observed in Barcelona, Spain, and Providence, US (Dennehy et al. 2001, Guix et al. 2002). The high rate of mixed infection was probably due to the poor sanitation conditions which prevail in the environments where these children are living. Dual infection involving HAstV and RV was also reported recently among Mexican children, suggesting this as being a relatively common finding (Méndez-Toss et al. 2004). In the Mexican study, HAstV was found at similar frequencies in both RV-positive and RV-negative diarrheic children, suggesting that no synergy occurs among infections caused by these two viruses (Méndez-Toss et al. 2004).

In this study, HAstVs were detected in 14 fecal specimens, four (28.6%) of which positive by EIA only, two (14.3%) by RT-PCR only, and eight (57.1%) reacting positive by both techniques. The differences in detection rates between these two techniques may be explained by the fact that EIA indicates the presence of both soluble and particle-associated HAstV antigen, while RT-PCR assays detect nucleic acid in intact virus particles. A few hypotheses should be considered in explaining such divergent results: (a) a possible false positive result; (b) nucleotide sequence differences in the primer hybridization region; and (c) the presence of inhibitors in the RT-PCR. This was previously observed by Maldonado et al. (1998) and Silva et al. (2001). It is worth mentioning that the four samples positive by EIA only were also examined by EM and virus particles with morphology typical of HAstV could be visualized in two of them. It seems likely that the presence

of defective viral particles at concentrations lower than that of EM sensitivity may have accounted for the negative results from examining two other samples (Silva et al. 2001).

As reported elsewhere (Polombo et al. 1996, Gaggero et al. 1998, Mustafa et al. 2000, Silva et al. 2001, Cardoso et al. 2002, Dalton et al. 2002, Guix et al. 2002, Espul et al. 2004), HAstV-1 was found to be the most prevalent genotype, with rates ranging from 38 to 100%.

It is worth mentioning that other HAstV genotypes (2, 3, 4, and 5) were circulating concurrently with the predominant genotype 1. The genotypic complexity of co-circulating strains differs from the findings of Noel et al. (1995) who demonstrated a clustering of strains with the same sequence circulating in various settings worldwide.

Genetic diversity was evident when we compared nucleotide and amino acid sequences of samples isolated in São Luís to the prototype strains from the United Kingdom. The detection of five different types co-circulating during a two-year period suggests that the genotype distribution of HAstV in São Luís varies throughout the time. This may have implications for the future development of possible HAstV vaccines.

The seasonal pattern of HAstV infection was well documented in studies carried out in both temperate and tropical regions of the world, where this virus was found to prevail either throughout the winter months or during the rainy season (Matsui & Greenberg 2001). In our study, which was conducted in a tropical region, we observed that most of the HAstV infections clustered in two periods: September to December 1997 and March to July 1999. The first period corresponds to a relatively dry season, with a temperature variation in the range of 27.5 to 28°C; and the second period, a typical rainy season, with a heavy rainfall (200 to 600 mm) and a temperature of around 27°C. It is noteworthy that all HAstV-1 strains were found during March-July 1999.

In this study, the highest infection rate (18%) among diarrheic children was observed in the 0 to 6 months age group. These results agree with those of Giordano et al. (2004) in Cordoba, Argentina, who reported a 24% HAstV-positivity in children 4 to 6 months old. Conversely, our results differ from those obtained in a 3-year study conducted in Barcelona, Spain (Guix et al. 2002), where the peak incidence was observed in older children, aged between 2 and 4 years, yielding a 9% positivity rate. In the non-diarrheic group HAstV was detected more frequently in older children, aged 18 to 24 months (25%). It should be pointed out, however, that such a peak incidence may have occurred by chance, owing to the low numbers in each group.

In our study, the percentages of vomiting (88.9%), fever (88.9%), and moderate dehydration (56%) were higher than those reported in a study in Madrid, Spain (65, 39, and 24%, respectively) conducted at an emergency room (Dalton et al. 2002).

Further surveillance studies to fully assess the epidemiological importance of HAstV among diarrheic and non-diarrheic children in São Luís are worth to be done, including a larger sample size. Since a RV vaccine is expected to become available soon, the search for other

potential enteropathogens such as HAstVs and noroviruses will gain increasing epidemiological importance.

ACKNOWLEDGMENTS

To technical assistance provided by Antonia S Alves and Antônio de Moura. To support given by Dr Olinda Macedo, Dr Darleise de Souza Oliveira, and Dr Maria de Lourdes C Gomes for DNA sequencing.

REFERENCES

- Appleton H, Higgins PG 1975. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* 1: 1297.
- Belliot G, Laveran H, Monroe SS 1997. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *J Med Virol* 51: 101-106.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noorda J 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.
- Cardoso DDP, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Martins RMB, Leite JPG 2002. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiânia, Goiás, Brazil. *Med Sci Monit* 8: CR624-628.
- Cruz JR, Bartlett AV, Herrmann JE, Caceres P, Blacklow NR, Cano F 1992. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J Clin Microbiol* 30: 1140-1144.
- Dalton RM, Roman ER, Negredo AA, Wilhelmi ID, Glass RI, Sánchez-Fauquier A 2002. Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. *Pediatr Infect Dis J* 21: 1038-1041.
- Dennehy PH, Nelson SM, Spangenberg S, Noel JS, Monroe SS, Glass RI 2001. A prospective case-control study of the role of astrovirus in acute diarrhea among hospitalized young children. *J Infect Dis* 184: 10-15.
- Espul A, Martinez N, Noel JS, Cuello H, Abrile C, Grucci S, Glass R, Berke T, Matson DO 2004. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *J Med Virol* 72: 75-82.
- Gaggero A, O'Ryan M, Noel JS, Glass RI, Monroe SS, Mamani N, Prado V, Avendano LF 1998. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 36: 3691-3693.
- Giordano MO, Martinez LC, Isa MB, Paez Rearte M, Nates SV 2004. Childhood astrovirus-associated diarrhea in the ambulatory setting in a public hospital in Cordoba city, Argentina. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 46: 93-96.
- Glass RI, Noel JS, Mitchell, D, Herrmann JE, Blacklow NR, Pickering LK, Dennehy P, Ruiz-Palacios G, De Guerreiro ML, Monroe SS 1996. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch Virol* 12: 287-300.
- Grohmann GS, Glass RI, Pereira HG, Monroe SS, Hightower AW, Wleber R, Bryan RT 1993. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 329: 14-20.
- Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolome R, Latorre C, Rabella N, Simo M, Bosch A, Pinto M 2002. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol* 40: 133-139.

714 Astrovirus infection in São Luís, Brazil • Yvone B Gabbay et al.

- Herrmann JE, Taylor DN, Echeverria P, Blacklow NR 1991. Astrovirus as a cause of gastroenteritis in children. *N Eng J Med* 324: 1757-1760.
- Jiang B, Monroe SS, Koonin EV, Stine SE, Glass RI 1993. 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 USA* 90: 10539-10543.
- Lee TW, Kurtz JB 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-1992, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol Infect* 112: 187-193.
- Leite JPG, Barth O.M, Schatzmayr HG 1991. Astrovirus in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 489-490.
- Madeley CR 1995. Comparison of the features of astrovirus and calicivirus seen in samples of feces by electron microscopy. *J Infect Dis* 139: 519-523.
- Maldonado Y, Cantwell M, Old M, Hill D, Sanchez ML, Logan L, Millan-Velasco F, Valdespino JL, Sepulveda J, Matsui S 1998. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *J Infect Dis* 178: 334-339.
- Matsui SM, Greenberg HB 2001. Astroviruses. In DM Knipe, PM Howley (eds), *Fields Virology*, 4th ed., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 875-893.
- Medina SM, Guitierrez MF, Liprandi F, Ludert JE 2000. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. *J Clin Microbiol* 38: 3481-3483.
- Méndez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, Guiscafere H, Cedillo R, Munoz O, Herrera I, Lopez S, Arias CF 2004. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J Clin Microbiol* 42: 151-157.
- Mustafa H, Palombo EA, Bishop RF 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J Clin Microbiol* 38: 1058-1062.
- Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 33: 797-801.
- Polombo EA, Bishop RF 1996. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J Clin Microbiol* 34: 1750-1753.
- Sakamoto T, Negidhi H, Wang QH, Akihara S, Kim B, Nishimura S, Kaneshi K, Nakaya S, Ueda Y, Sugita K, Motohiro T, Nishimura T, Ushijima H 2000. 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* 61: 326-331.
- Schnagl RD, Belfrage K, Farrington R, Hutchinson K, Lewis V, Erlich J, Morey F 2002. Incidence of human astrovirus in Central Australia (1995 to 1998) and comparison of deduced serotypes detected from 1981 to 1998. *J Clin Microbiol* 40: 4114-4120.
- Silva AM, Leite EG, Assis RM, Majerowicz S, Leite JP 2001. An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 in a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 1069-1073.
- Steele AD, Basetse HR, Blacklow NR, Herrmann JE 1998. Astrovirus infection in South Africa: a pilot study. *Ann Trop Paediatr* 18: 315-319.
- Tanaka H, Kisielius JJ, Ueda M, Glass RI, Joazeiro PP 1994. Intrafamilial outbreak of astrovirus gastroenteritis in São Paulo, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* 12: 219-221.
- Timenetsky MCST, Kisielius JJ, Grisi SJFE, Escobar AMU, Ueda M, Tanaka H 1993. Rotavírus, adenovírus, astrovírus, calicivírus e "small round vírus 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* 35: 275-280.
- Unicomb LE, Banu NN, Azim T, Islam A, Bardhan PK, Faruque ASG, Hall A, Moe CL, Noel JS, Monroe SS, Albert MJ, Glass RI 1998. Astrovirus infection in association with acute, persistent and nosocomial diarrhea in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J* 17: 611-614.
- Willcocks MM, Brown TDK, Madeley CR, Carter MJ 1994. The complete sequence of a human astrovirus. *J Gen Virol* 75: 1785-1988.

APÊNDICE C:

GABBAY YB, LEITE JPG, OLIVEIRA DS, NAKAMURA LS, NUNES MRT, MASCARENHAS JDP, 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 Reserch*, In Press.



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

Yvone B. Gabbay^{a,*}, José Paulo G. Leite^b, Darleise S. Oliveira^a, Lilianny S. Nakamura^a, Marcio R.T. Nunes^c, Joana D'Arc P. Mascarenhas^a, Marcos Brian Heinemann^d, Alexandre C. Linhares^a

^a Virology Section, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rodovia BR 316, Km 07, S/N, Levilândia 67030-000, Ananindeua, PA, Brazil

^b Department of Virology, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^c Department of Arbovirology and Hemorrhagic Fevers, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rodovia BR, 316 Km 07, S/N, Levilândia 67030-000, Ananindeua, PA, Brazil

^d Veterinary School, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

Received 12 April 2007; accepted 12 July 2007

Abstract

Human astroviruses (HAstV) are worldwide recognized as important viral enteropathogens during childhood. This study aims to determine the incidence, genetic diversity and intertype variability of HAstV-1 in children less than 5 years of age enrolled in several studies conducted in Belém/Pará, and São Luís/Maranhão, Brazil, from December 1982 to May 2000. Using EIA and RT-PCR, an overall positivity of 6.1% (155/2,534) was achieved, of these, 140 were positive by RT-PCR. The analysis of a 348 bp ORF2 fragment revealed that HAstV-1 was the predominant genotype (85/140, 60.7%) throughout the 18 years of study. Phylogenetic analysis was performed for 81 of these strains, and 76 (93.8%) were genetically classified as HAstV-1a. The remainder of strains ($n=5$) were assigned to possible new lineages, 1e and 1f. Four of these five strains were detected in 1983 and 1984, and the lineage 1a circulated during 10 consecutive years (1990/2000). Genome sequence variation was found among the HAstV-1 strains involving all lineages, but only five nucleotide changes translated into aminoacid changes over this period, suggesting that HAstV-1 was very stable. The data obtained in this study should be useful for further studies at molecular level, including improvement of disease surveillance based on molecular diagnostic tools, and vaccine development.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Astrovirus type 1; New lineages; Genetic diversity; Eighteen years study; Diarrheic children; Belém-Brazil

1. Introduction

Human astroviruses (HAstVs) are members of the *Astroviridae* family, *Mamastrovirus* genus, being recognized as one of the most common cause of viral gastroenteritis in infants

and young children (Glass et al., 1996; Monroe et al., 2005). These small, non-enveloped viruses contain a single-stranded polyadenylated positive-sense RNA genome, about 7 kb in length.

The genome consists of three sequential open reading frames (ORFs). ORF1a and ORF1b are located at the 5' end of the genome, and encode non-structural viral proteins, which are a serine protease and a RNA-dependent RNA polymerase, respectively (Jiang et al., 1993; Willcocks et al., 1994). The third is ORF2, located at the 3' end of the genome, which encodes the capsid protein precursor (Carter and Willcocks, 1996).

The sequence analysis of a 348 nucleotide region of ORF2 (located between nucleotides 258 and 606) has commonly been

* Corresponding author. Tel.: +55 91 32142015; fax: +55 91 32142005.

E-mail addresses: yvonegabbay@iec.pa.gov.br (Y.B. Gabbay), jpgleite@ioc.fiocruz.br (J.P.G. Leite), darleiseoliveira@iec.pa.gov.br (D.S. Oliveira), satikohana@gmail.com (L.S. Nakamura), marcionunes@iec.pa.gov.br (M.R.T. Nunes), joanamascarenhas@iec.pa.gov.br (J.D.P. Mascarenhas), mabryan@vet.ufmg.br (M.B. Heinemann), alexandrelinhares@iec.pa.gov.br (A.C. Linhares).

used for typing the eight known genotypes of HAstV (HAstV-1 to HAstV-8) (Mustafa et al., 2000). These genotypes show a good correlation with the HAstV serotypes detected by enzyme immunoassay (EIA), using either type-specific polyclonal or monoclonal antibodies (Herrmann et al., 1988; Noel et al., 1995), and with the HAstV type-specific primers by RT-PCR (Matsui et al., 1998; Sakamoto et al., 2000).

Epidemiological studies conducted in several countries indicate that HAstV-1 is the most prevalent genotype and the others genotypes (HAstV-2 to HAstV-8) are in general detected at lower percentages, mostly co-circulating with the HAstV-1 (Guix et al., 2002; Méndez-Toss et al., 2004; Mustafa et al., 2000). Variations in the prevalence rates of these genotypes have been observed (Méndez-Toss et al., 2004; Palombo and Bishop, 1996). Studies conducted in Brazil have demonstrated a pattern similar to those reported elsewhere, with HAstV-1 being predominant and the other genotypes, including HAstV-2–5 and -8 also circulating (Cardoso et al., 2002; Gabbay et al., 2005; Silva et al., 2001, 2006; Victoria et al., 2007).

As based on the sequence variations observed among strains of a single type, some authors (Guix et al., 2002; Medina et al., 2000) have proposed that strains showing a sequence diversity of at least 7%, can be regarded as new lineages. In light of this, HAstV-1 has been classified into four lineages (1a–1d), and HAstV-2 (2a and 2b) and HAstV-4 (4a and 4b) into two lineages each.

The purpose of this study was to determine the incidence, the genetic diversity and intertype variability of HAstV-1 through the analysis of a fragment of 348 pb of the ORF2 region. The samples studied were collected during studies conducted in

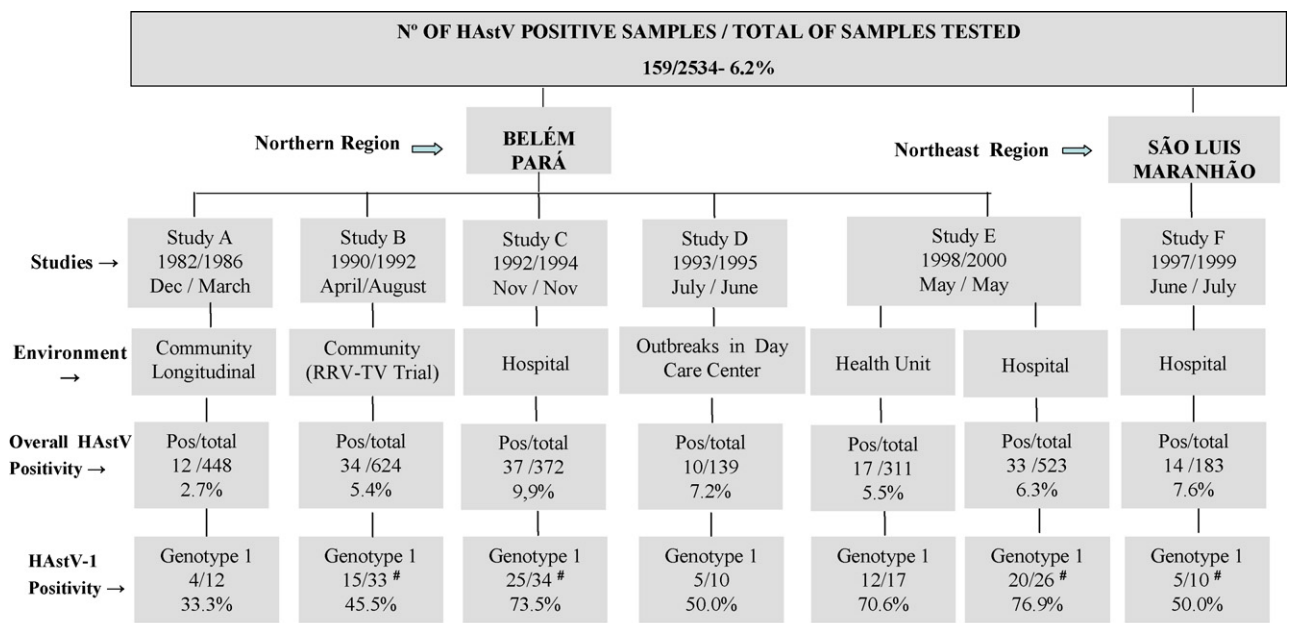
Belém, Pará during 18 years and in São Luís, Maranhão, northern and northeast regions of Brazil, respectively. The analyses of these HAstV-1 strains demonstrated the pattern of circulation of this virus type during this period, and also showed the identification of two possible new lineages by comparison of these strains with other from different places.

2. Materials and methods

2.1. Patients and specimens

Stool samples were obtained from children with acute diarrhea, defined as three or more liquid or semi-liquid stools in a 24 h period, aged less than 5 years, who participated in six different studies carried out at the Evandro Chagas Institute (IEC), Belém, Northern Brazil between 1982 and 2000. The studies were conducted according with local and international Ethical and Biosafety rules. Some of these studies required that signed informed consents were provided by parents or legal guardians, as well as approval from ethical review committees. Standard questionnaires were used to gathering main clinical- and epidemiological data from each subject. All samples collected during such studies were primarily screened for rotavirus antigen, being stored thereafter at -20°C for further studies. Key information from each study is presented below and summarized in Fig. 1.

- *Study A.* From December 1982 to March 1986 a longitudinal study was carried out in the outskirts of Belém involving 80 children who were followed-up from birth to 3 years of age



Some samples were positive for HAstV by EIA and negative by RT-PCR

⇒ A total of 142 samples were positive for HAstV by RT-PCR: 60.6% (86/142) for HAstV-1, 23.9% (34/142) for HAstV-2, 4.2% (6/142) for HAstV-3, 4.9% (7/142) for HAstV-4, 2.1% (3/142) for HAstV-5, 0.7% (1/142) for HAstV-6 and 8, 1.4% (2/143) for HAstV-7 and 1.4% (2/143) samples were not genotyping

Fig. 1. Temporal disposition and characteristics of studies conducted in Belém and São Luis, Brazil, during 18 years (December 1982–May 2000).

(Linhares et al., 1989). A subgroup of 37 children was selected randomly, and some of their serially collected stools (total of 448) were used for astrovirus detection. Most of stools were collected during diarrheic episodes and some of them from asymptomatic children.

- *Study B.* Stool specimens were collected in episodes of gastroenteritis during a large placebo-controlled efficacy trial of rhesus-human reassortant tetravalent (RRV-TV) rotavirus vaccine (Linhares et al., 1996) conducted from April 1990 to August 1992. This trial was carried out in the outskirts of Belém involving 540 children who were followed-up for 2 years to assess efficacy of the vaccine. Surveillance for gastroenteritis included twice-a-week home visits to each child. From the 3075 feces obtained during this study, 624 were selected randomly for astrovirus detection, accounting for 20% of the subjects (Gabbay et al., 2007).
- *Study C.* From November 1992 to 1994 a daily surveillance was conducted targeting children aged 0–5 years hospitalized in a public hospital in Belém, with the objective of determining the rotavirus frequency, mainly in cases of nosocomial gastroenteritis (Gusmão et al., 1999). A total of 372 specimens were obtained and tested for HAstV.
- *Study D.* A surveillance was conducted in two day-care centers in Belém from July 1993 to June 1995, with the purpose of detecting outbreaks of acute gastroenteritis and to assess the viral etiology (Gabbay et al., 1999). Overall, 10 outbreaks were studied and 139 specimens could be obtained.
- *Study E.* A regular surveillance was accomplished at a public health unit and in a private pediatric hospital in Belém from May 1998 to 2000, with the primary objective of determining the circulating rotavirus serotypes (Mascarenhas et al., 2007). The health unit was visited twice-a-week and in the hospital a daily surveillance was performed. Overall, 834 fecal specimens were collected, of which 311 samples from the health unit and 523 from the hospital, and all of them were tested for HAstV.
- *Study F.* From June 1997 to July 1999 a hospital-based surveillance was conducted at a large public-and-teaching hospital in São Luís, Maranhão, Northeastern Brazil. This study included children less than 2 years of age, from low-income families, living in the central area of this city (Luz et al., 2005). Of 245 fecal specimens obtained during the surveillance study and 183 samples were available in sufficient amount to be tested for HAstV (Gabbay et al., 2005).

2.2. Antigenic test

2.2.1. Enzyme immunoassay (EIA)

All 2534 samples used in these studies, including those positive for rotavirus, were screened for HAstV antigen using the EIA technique. For study A it was used a kit kindly supplied by Dr. Roger Glass (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). For the other studies a commercial qualitative EIA kit (IDEIA™, DakoCytomation, Ely, UK) was used, following the manufacturer's recommendations.

2.3. Genome amplification and nucleotide sequencing

2.3.1. RNA extraction

The viral ssRNA was extracted from fecal suspensions using silica powder glass extraction, as previously described by Boom et al. (1990) with modifications by Cardoso et al. (2002).

2.3.2. Reverse transcription-polymerase chain reaction

The RT-PCR was carried out with all HAstV-positive samples by EIA and also included those samples that showed an optical density value of at least twice that of the negative control. The primers used (Mon 269 and Mon 270) targeted the ORF2 region (4526–4974 nt), and the amplification conditions were those described by Noel et al. (1995). In the RT reaction a random hexamer (pd [N]₆-50 A₂₆₀ units, Amersham Biosciences, USA) was introduced to obtain the cDNA and the PCR reaction was performed as described by Gabbay et al. (2005). Samples showing a specific amplicon of 449 bp were considered positive. Water was used as a negative control in all procedures and recommended manipulations for PCR techniques were strictly followed as a precaution to avoid false-positive results.

2.3.3. Sequencing of HAstV amplicons

The nucleotide sequencing was done as reported by Gabbay et al. (2005), using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Town, USA) and the primers Mon 269 and Mon 270. The products were analyzed using an automatic ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

2.3.4. Multiple sequence alignment and phylogeny

Sequence data from both strands were aligned and edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor (v.7.0.5.2) program and compared with eight prototype sequences as follows: HAstV1 (L23513), HAstV2 (L13745), HAstV3 (L38505), HAstV4 (L38506), HAstV5 (U15136), HAstV6 (L38507), HAstV7 (L38508), Oxford reference strains and HAstV-8 (Z66541), United Kingdom reference. In addition, the strains of this study were compared to type 1 strains detected in Brazil, BrG1-5, DQ139825; BrG1-9, DQ139827; BrG1-10, DQ139828; BrG1-12, DQ139826; 1157, AY846636; 1158, AY846637; 1166, AY846639; RJ8198, DQ381489; RJ8408, DQ381475 and AC10BR/2005, EF547371; Argentina, Arg053, AY324860; Arg158, AY324858; Arg319, AY324861 and Arg660, AY324863; Colombia, Col359, DQ157438; Col503, AF211964 and Col526, AF211962; Venezuela, Ven835, AF211956; Spain, Bcn1-1, AF348753; Bcn1-5, AF348757; Bcn1-7, AF348759 and Bcn1-15, AF348767; Australia, RCH1A, U49216; RCH1B, U49217 and Melb1E, AF175253; Germany, ORA/1, AY007579; SWE/3.2, AY007583; PIR/4/98, AY007580 and HEU/2.3, AY007578; and Newcastle, A88-2, S68561.

Phylogenetic trees were constructed using the MEGA software version 3.1 (Kumar et al., 2004) by both neighbor-joining (NJ) and maximum parsimony (MP) methods. For NJ, a distance matrix calculated from the aligned sequences by Kimura two-parameters formula (Kimura, 1980) was used, and a weight

of 4 for transitions versus 1 for transversion was selected. In MP, in order to obtain the most parsimonious tree, the heuristic algorithm method was performed; and for determining the reliability of tree topology, bootstrap analysis (Felsenstein, 1995) was carried out on 2000 replicates.

2.3.5. Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences determined in this study have been deposited in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and assigned the accession numbers: strains from Belém-Pará (Study A: EF535737–EF535740; Study B: DQ917375–DQ917381 and DQ917383–DQ917390; Study C: EF535741–EF535765; Study D: EF535733–EF535736; Study E: EF535766–EF535793) and from São Luís-Maranhão (Study F: DQ071651–DQ071654 and DQ071656).

3. Results

From December 1982 to May 2000 a total of 2534 fecal specimens collected from different studies were selected and screened for HAstV by EIA, with an overall positivity rate of 4.8% (123/2534). RT-PCR was performed in 323 specimens: 123 which were HAstV-positive by EIA and 200 that showed an optical density value of at least twice that of the negative control by EIA. The combined positivity rates for HAstV using EIA and RT-PCR was 6.1% (155/2534) (Fig. 1). Of these, 108 samples were positive by both techniques, 32 were positive by PCR only and 15 by EIA only.

Nucleotide sequence data were obtained from all 140 RT-PCR positive samples and the analysis of the 348 bp region of the capsid demonstrated that 85 of these strains were classified as HAstV-1. The other 55 strains were classified as other genotypes (Fig. 1). When comparing all sequences of HAstV-1, it was observed that in four strains some nucleotides could not be defined and they were not included in our analysis. Similar topologies were demonstrated during the construction of the phylogenetic tree, using the NJ and MP methods, although bootstrap values were slightly higher for tree constructed by the NJ method. In this case, the NJ tree was used for the analysis. The tree contains the 81 HAstV-1 strains from our study and strains from other countries, including Brazil (Fig. 2). A total of 76 HAstV-1 strains clustered into the lineage 1a, which was segregated into three groups, with a mean distance into groups of 0.1–1.1% and between groups of 2.5–3.8%. The emergence of these groups seems to be temporal-related. The group 1 was composed by 40 strains collected in the years of 1990 ($n=4$), 1991 (9), 1993 (23), 1994 (3) and 2000 (1). The group 2 comprised three strains obtained in 1992 (1) and 1994 (2). The group 3 gathered 33 strains from 1991 ($n=1$), 1998 (11), and 1999 (21), of these, five (all collected in 1999) were from São Luís. The remaining five strains were proposed as new lineages (1e and 1f), as based on a sequence variation of $\geq 7\%$ for the analyzed ORF2 region (Guix et al., 2002; Medina et al., 2000) and supported by high bootstrap values (100%). Three strains were grouped into lineage 1e, with a mean distances with the other lineages ranging from 7.2 to 10.9%, except for lineage 1d which showed a difference of 5.1%. The other two strains were classified as

1f, showing a mean distance of 7.2–13.4% when this lineage is compared with all other lineages.

The nucleotide (nt) sequence of the HAstV-1 prototype was compared with the sequences of the three groups of HAstV-1a and some changes were observed (Fig. 3). In group 1, six nucleotides changes (390A \rightarrow G, 510T \rightarrow C, 525A \rightarrow G, 552C \rightarrow T, 561T \rightarrow C, 580C \rightarrow T) were demonstrated in all 40 strains from our study. The three strains belonging to group 2 showed a 100% similarity with the prototype. Seven nucleotide changes (273G \rightarrow A, 409C \rightarrow T, 432A \rightarrow G, 471C \rightarrow T, 534G \rightarrow A, 552C \rightarrow T, 580C \rightarrow T) were noted in all the 33 strains from group 3. Two nucleotide changes (552C \rightarrow T, 580C \rightarrow T) were observed in all strains of groups 1 and 3. The comparison of the HAstV-1 prototype with the five strains proposed as new lineages, displayed major nucleotide changes for lineages 1e ($n=3$); these changes comprised 25 nt and for lineage 1f ($n=2$) 28 nt. In addition, 15 of these nucleotide changes were common to both lineages (Fig. 4).

Nucleotide sequence changes resulting in amino acid (aa) substitutions related to the HAstV-1 prototype were observed in five strains only: PANSC301BR/1993 (V \rightarrow D change at aa 148 and S \rightarrow T at aa 151), PACOD195BR/1991 (V \rightarrow D at aa 186), MA-167/1999 (K \rightarrow R at aa 138), PALONG24072(21)BR/1983 and PALONG24080(20)BR/1983 (both S \rightarrow A in aa 197). Of interest, the changed occurred in two of these aa (V \rightarrow D), involving an alteration of neutral to acidic.

4. Discussion

The present study took advantage of the availability of a large collection of stool samples gathered from five different studies conducted in Belém, throughout a period of 18 years (1982–2000), and one study carried out in São Luís-Maranhão. After the detection of the HAstV samples by RT-PCR, and genotyping by sequencing, all HAstV-1-positive sequences were selected and used to assess genetic diversity and intratype variability. HAstV-1 was chosen due to its general highest prevalence demonstrated in most of the studies conducted all over the world (Guix et al., 2002; Méndez-Toss et al., 2004; Mustafa et al., 2000; Silva et al., 2006).

The overall HAstV-positivity rate in Belém and São Luís (6.1%) was similar to those recorded in Mexico City (6.8%) (Walter et al., 2001). Our rates were higher than that of 1.6% reported in a hospital in Hungary (Jakab et al., 2004) and lower than the 12.4 and 14% rates described for Cordoba City and Rio de Janeiro, respectively (Giordano et al., 2004; Victoria et al., 2007). One should be in mind, however, that our study focused on several environments such as community, health unit, day-care centers and hospitals (Fig. 1). For this reason, a variation in the positivity rates was observed, being lower in those studies conducted in the community (2.7 and 5.4%) and in health unit (5.5%) and higher within the hospital (6.3–9.9%). These letter rates are suggestive that HAstV are likely to cause severe disease in young children.

Studies conducted in a periurban area in the southwestern outskirts of Mexico City, and during a trial with RRV-TV rotavirus vaccine in Finland yielded prevalence rates of 5 and 9%, respec-

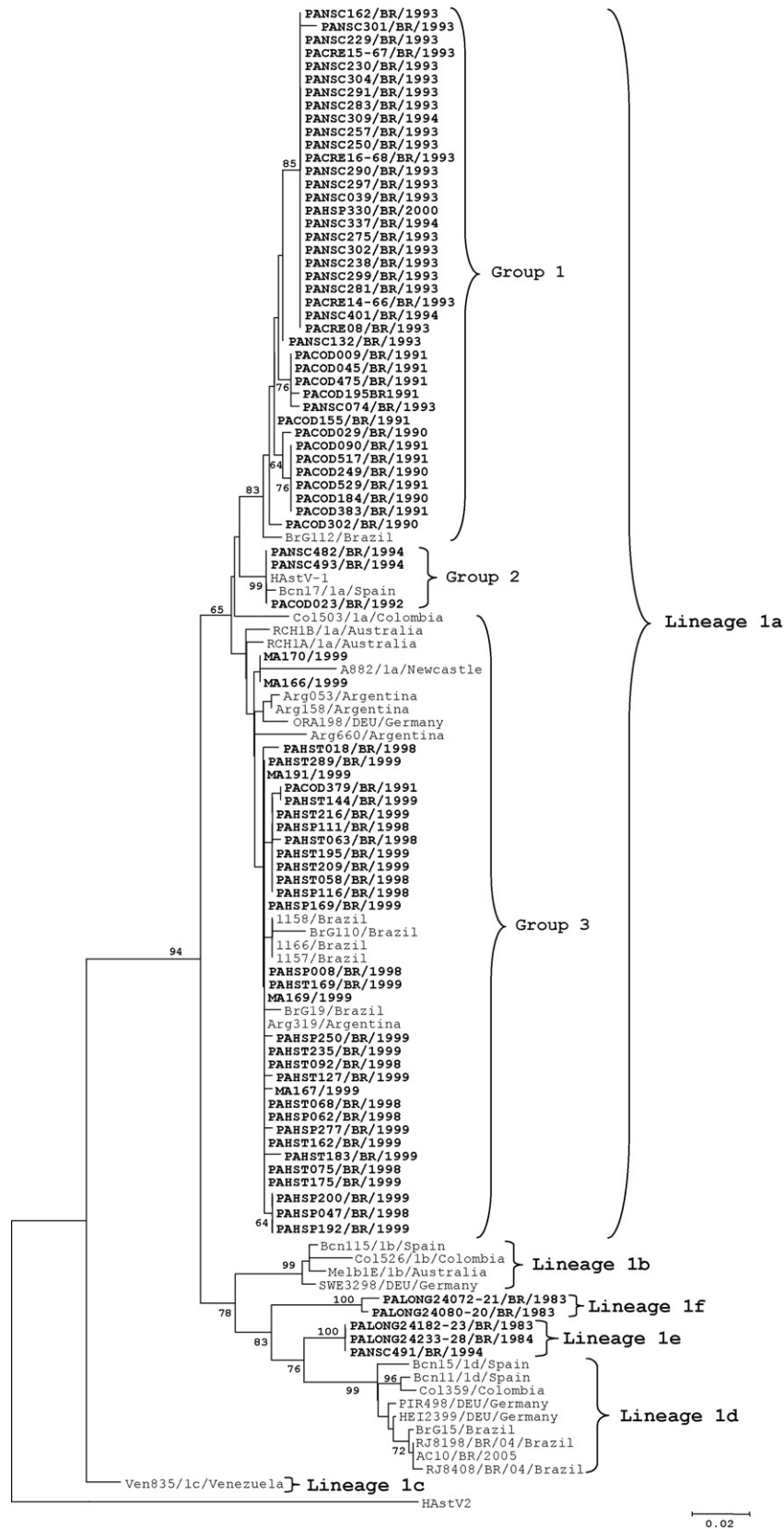


Fig. 2. Neighbor-joining unrooted phylogenetic tree of partial region (348 bp) of human astrovirus (HastV) ORF2 capsid region of 84 strains collected in Belém and São Luís, Brazil, from December 1982 to May 2000. Prototypes of HASTV-1 and -2 are presented in the illustration, together with strains from other places. The number above the branches corresponds to the bootstrap values. The strains of each study are indicated by a code: study A, LONG; study B, COD; study C, NSC; study D, CRE; study E, HSP and HST; study F, MA.

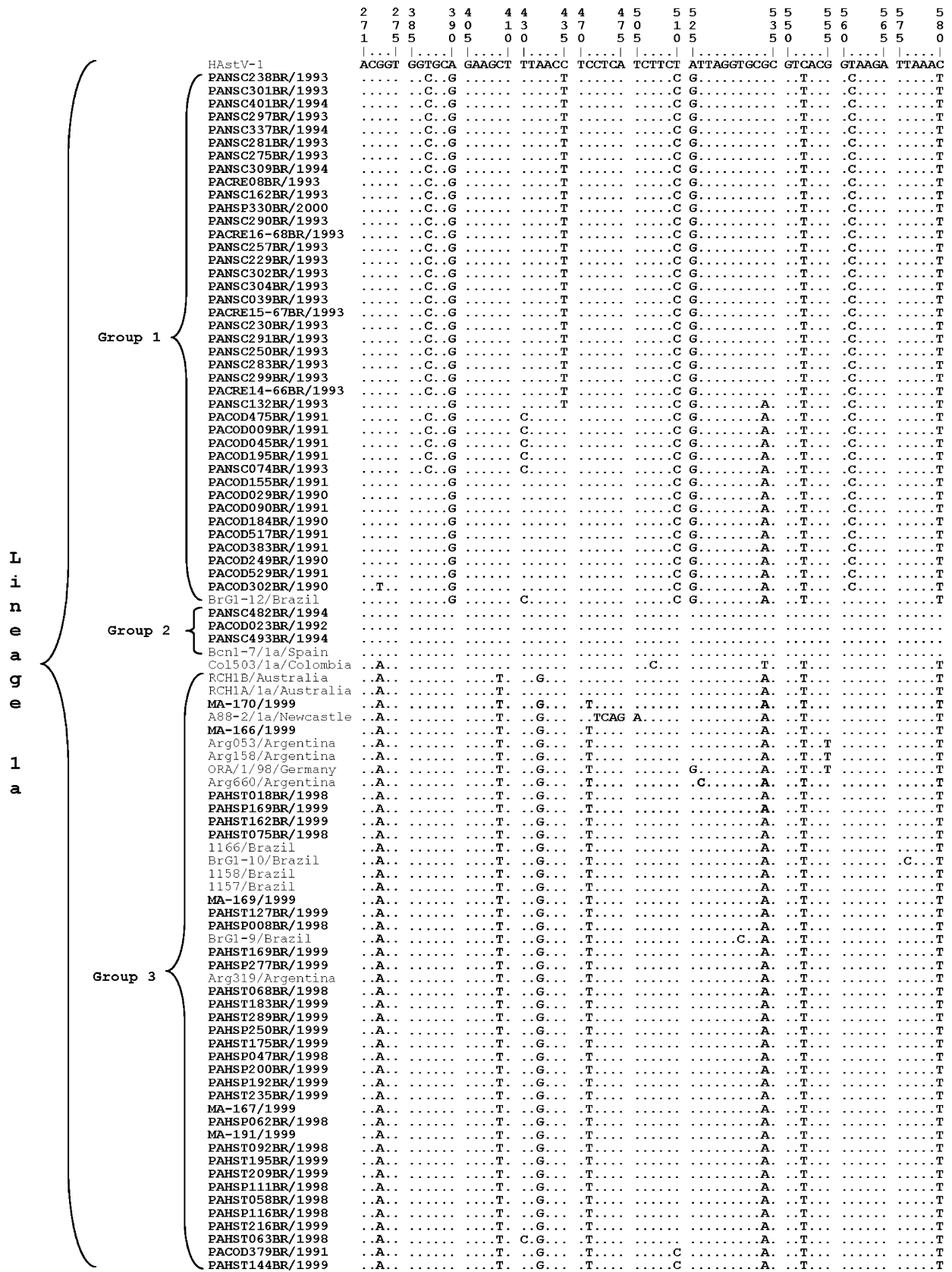


Fig. 3. Multiple sequences alignment of human astrovirus genotype 1a (HAstV-1a) strains by group with other HAstV-1a. Dots indicate similarity to the HAstV-1 prototype. The strains of each study are indicated by a code: study B, COD; study C, NSC; study D, CRE; study E, HSP and HST; study F, MA.

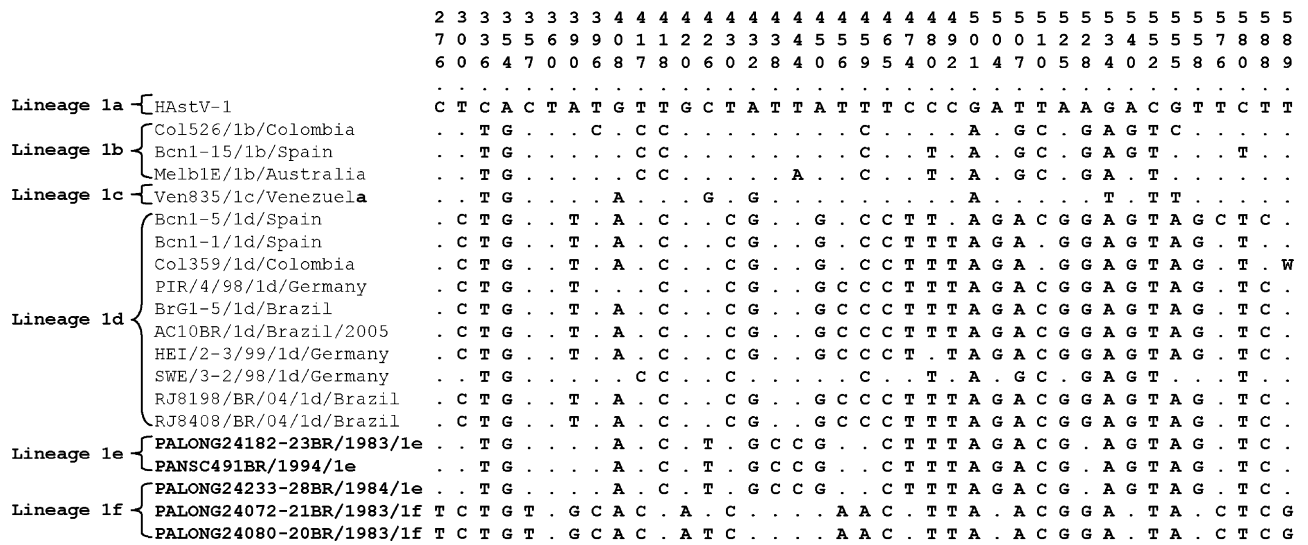


Fig. 4. Multiple sequences alignment of human astrovirus genotype 1e and 1f (HAstV-1e and -1f) strains by comparison with HAstV-1a–1d strains. Dots indicate similarity to the HAstV-1 prototype. The strains of study A and study C are indicated by code LONG and NSC, respectively.

tively, that were either similar or higher than that of our study (Guerrero et al., 1998; Pang and Vesikari, 1999).

Of the 10 outbreaks studied during the 2 years of surveillance done in the two day-care centers of Belém, HAstV was detected in four of them, and in two outbreaks it was the sole virus enteropathogen found. This virus has already been associated with outbreaks in day-care centers in Norfolk, Virginia and in Rio de Janeiro (Mitchell et al., 1999; Silva et al., 2001).

Of note, several studies have demonstrated the importance of HAstV as a cause of hospitalization during childhood (Espul et al., 2004; Guix et al., 2002; Jakab et al., 2004). The percentages in Belém (6.3–9.9%) were higher than those reported previously for other settings (3–4.9%) such as: Melbourne, Cordoba, Barcelona, Central Australia and Mexico (Giordano et al., 2001; Guix et al., 2002; Méndez-Toss et al., 2004; Mustafa et al., 2000; Schnagl et al., 2002). However, it was lower than the 11.4 and 16% rates detected in Spanish and Chilean diarrheic children, respectively (Dalton et al., 2002; Gaggero et al., 1998).

With regards to the prevalence of HAstV infection in Brazil, most of the studies have been conducted in public hospitals, yielding prevalence rates that range from 3 to 5% (Cardoso et al., 2002; Leite et al., 1991; Timenetsky et al., 1993) which seem lower than those reported in Belém. However, another study conducted recently in three hospitals in Rio de Janeiro demonstrated a higher prevalence (14%) than that of Belém (Victoria et al., 2007).

HAstV-1 was the predominant genotype (60.7%) throughout this 18-year period (Fig. 1), except for study A (longitudinal study) where genotype 2 accounted for the majority of isolates, with a 58.3% (7/12) positivity rate. Our results for HAstV-1 are in agreement with the findings from previous studies conducted worldwide, including Brazil (Cardoso et al., 2002; Dalton et al., 2002; Espul et al., 2004; Guix et al., 2002; Victoria et al., 2007). It is worth mentioning that all other HAstV genotypes circulating in Belém during this period occurred at much lower rates (0.7–5.0%), except for HAstV-2, with a positivity of 23.6%

(Fig. 1). The importance of HAstV-2 genotype has also been demonstrated in two other studies: one conducted in a periurban community of Mexico City, where this type was the most prevalent; and in an emergency room of a hospital in Madrid where it appeared as the second most common genotype (Dalton et al., 2002; Walter et al., 2001).

Of note, during 10 consecutive years of our study (1990–2000), 76 (93.8%) of the 81 tested samples were classified as HAstV-1a. The observation that only one lineage circulated throughout this entire period is in contrast with the results obtained in Bogota, Colombia, where in a study conducted from June 1997 to February 1999 two lineages were identified: HAstV-1a and 1b (Medina et al., 2000). The same pattern was observed by Guix et al. (2002) in Barcelona, Spain, where the lineage HAstV-1a, 1b and a new 1d, were detected during a period of 3 years (May 1997–April 2000).

The analysis of seven HAstV-1 strains obtained from the GenBank, coming from a study conducted in Central Australia for a period of 18 years (1981–1998), demonstrated that HAstV-1a was the sole type detected during 14 consecutive years (1982–1995), a period larger than the 10 years observed in Belém. The lineage HAstV-1b also circulated in Central Australia during 1996–1998 (Schnagl et al., 2002). It is worth mentioning that in studies conducted in other regions of Brazil, the circulation of the lineage 1d was reported more recently, from 2003 to 2005, therefore after our study period (Silva et al., 2006; Victoria et al., 2007).

Furthermore, the other five strains detected in Belém (four between 1983 and 1984 and one in 1994) were proposed as new lineages namely 1e and 1f. Both lineages circulated concomitantly, demonstrating at least 7% sequence diversity when compared to other lineages, except for a comparison between 1e and 1d that displayed a 5% divergence.

Genome sequence variation was found among the Belém HAstV-1 strains, but the fact that only five nucleotide changes translated into aa changes over the long period of 18 years sug-

gests a significant genetic stability of local circulating HAstV-1. The results are comparable to the findings of Palombo and Bishop (1996); Mustafa et al. (2000); and Schnagl et al. (2002), in studies conducted in Melbourne and Central Australia, where the analysis of the same 348nt ORF2 region indicated either any or only one aa change. Such a suggested stability can be related to the chosen region (ORF2) in these studies, which is a relatively conserved in the HAstV capsid protein precursor gene. In contrast, a genetic diversity with predictable aa changes were observed by Medina et al. (2000) in samples from Colombia and Venezuela, but these changes occurred mainly in the strains classified as HAstV-1b and -1c.

The results of our study provide additional epidemiological and molecular data on the HAstV circulation in the northern and northeast region of Brazil, and highlight the potential of this virus as a cause of infantile acute gastroenteritis in various environmental studies, with emphasis to HAstV-1. The circulation of the lineage 1a during 10 years seems to be relevant epidemiological finding in view of a possible future development of HAstV vaccines. Further studies using stool samples collected more recently are needed to assess whether HAstV-1d circulated in north region in comparison to other regions of Brazil (Silva et al., 2006; Victoria et al., 2007).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the valuable technical support provided by the Dr. Olinda Macêdo, Maria de Lourdes C. Gomes, Ivete V. Costa, Elielma L. Cavalcante-Pepino, Luciana D. da Silva, and by Mrs. Antonia Alves, Maria Silvia de Lucena, Mr. Antonio Francisco P Martins, and Antônio de Moura. Thanks are also due to the field staff and physicians who collaborated with us in all studies. Lilianny S. Nakamura received a grant fellowship from the National Council for the Development of Science and Technology, Brasília, Federal District, Brazil (CNPq). This study received financial support from Pará State Secretary of Science and Technology (SECTAM/FUNTEC/PA), IEC/SVS/MS, IOC/FIOCRUZ, and CNPq.

References

Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E., Van Der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.

Cardoso, D.D.P., Fiaccadori, F.S., Souza, M.B.L.D., Martins, R.M.B., Leite, J.P.G., 2002. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiânia, Goiás Brazil. *Med. Sci. Monit.* 8, CR624–CR628.

Carter, M.J., Willcocks, M.M., 1996. The molecular biology of astroviruses. *Arch. Virol.* 12 (Suppl), 277–285.

Dalton, R.M., Roman, E.R., Nagredo, A.A., Wilhelmi, I.D., Glass, R.I., Sanchez-Fanquier, A., 2002. Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21, 1038–1041.

Espul, A., Martinez, N., Noel, J.S., Cuello, H., Abrile, C., Grucci, S., Glass, R., Berke, T., Matson, D.O., 2004. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *J. Med. Virol.* 72, 75–82.

Felsenstein, J., 1995. PHYLIP, Version 3.57c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA.

Gabbay, Y.B., Jiang, B., Oliveira, C.S., Mascarenhas, J.D.P., Leite, J.P.G., Glass, R.I., Linhares, A.C., 1999. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care center in Belém. Brazil. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 17, 69–74.

Gabbay, Y.B., Linhares, A.C., Cavalcante-Pepino, E.L., Nakamura, L.S., Oliveira, D.S., Silva, L.D., Mascarenhas, J.D.P., Oliveira, C.S., Monteiro, T.A.F., Leite, J.P.G., 2007. Prevalence of human astrovirus genotypes associated with acute gastroenteritis among children in Belém, Brazil. *J. Med. Virol.* 79, 530–538.

Gabbay, Y.B., Luz, C.R.N.E., Costa, I.V., Cavalcante-Pepino, E.L., Sousa, M.S., Oliveira, K.K., Wanzeller, A.L.M., Mascarenhas, J.D.P., Leite, J.P.G., Linhares, A.C., 2005. Prevalence and genetic diversity of astrovirus in children with and without diarrhea in São Luís, Maranhão, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 709–714.

Gaggero, A., O’Ryan, M., Noel, J.S., Glass, R.I., Monroe, S.S., Mamani, N., Prado, V., Avendano, L.F., 1998. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3691–3693.

Giordano, M.O., Martinez, L.C., Isa, M.B., Paez Rearte, M., Nates, S.V., 2004. Childhood astrovirus-associated diarrhea in the ambulatory setting in a public hospital in Cordoba City, Argentina. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 46, 93–96.

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

Glass, R.I., Noel, J.S., Mitchell, D., Herrmann, J.E., Blacklow, N.R., Pickering, L.K., Dennehy, P., Ruiz-Palacios, G., De Guerreiro, M.L., Monroe, S.S., 1996. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch. Virol.* 12, 287–300.

Guerrero, M.L., Noel, J.S., Mitchell, D.K., Calva, J.J., Morrow, A.L., Martinez, J., Rosales, G., Velazquez, F.R., Monroe, S.S., Glass, R.I., Pickering, L.K., Ruiz-Palacios, G.M., 1998. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr. Infect. Dis.* 17, 723–727.

Guix, S., Caballero, S., Villena, C., Bartolome, R., Latorre, C., Rabella, N., Simo, M., Bosch, A., Pinto, M., 2002. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40, 133–139.

Gusmão, R.H., Mascarenhas, J.D., Gabbay, Y.B., Lins-Laison, Z., Ramos, F.L., Monteiro, T.A., Valente, S.A., Fagundes-Neto, U., Linhares, A.C., 1999. Rotavirus subgroups, G serotypes, and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belém, Brazil. *J. Trop. Pediatr.* 45, 81–86.

Herrmann, J.E., Hudson, R.W., Perron-Henry, D.M., Kurtz, J.B., Blacklow, N.R., 1988. Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 158, 182–185.

Jakab, F., Meleg, E., Bányai, K., Meleg, B., Tímár, L., Péterfai, J., Szücs, G., 2004. One-year survey of astrovirus infection in children with gastroenteritis in a large hospital in Hungary: occurrence and genetic analysis of astroviruses. *J. Med. Virol.* 74, 71–77.

Jiang, B., Monroe, S.S., Koonin, E.V., Stine, S.E., Glass, R.I., 1993. 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.* 90, 10539–10543.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Gen. Virol.* 77, 1761–1768.

Kumar, S., Tamura, A., Nei, M., 2004. MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5, 150–160.

Leite, J.P.G., Barth, O.M., Schatzmayr, H.G., 1991. Astrovirus in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86, 489–490.

Linhares, A.C., Gabbay, Y.B., Mascarenhas, J.D.P., Freitas, R.B., Oliveira, C.S., Bellesi, N., Monteiro, T.A.F., Lins-Laison, Z., Ramos, F.L.P., Valente, S.A., 1996. Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil. *Bull. W.H.O.* 74, 491–500.

Linhares, A.C., Gabbay, Y.B., Freitas, R.B., Travassos Da Rosa, E.S., Mascarenhas, J.D.P., Loureiro, E.C.B., 1989. Longitudinal study of rotavirus

- infection among children from Belém, Brazil. *Epidemiol. Infect.* 102, 129–145.
- Luz, C.R., Mascarenhas, J.D.P., Gabbay, Y.B., Motta, A.R., Lima, T.V., Soares, L.S., Linhares, A.C., 2005. Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalized children São Luís, Maranhão, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 47, 287–293.
- Mascarenhas, J.D.P., Linhares, A.C., Gabbay, Y.B., Lima, C.S., Guerra, S.F.S., Soares, L.S., Oliveira, D.S., Lima, J.C., Macêdo, O., Leite, J.P.G., 2007. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. *Virus Res.* (19 March, Epub ahead of print).
- Matsui, M., Ushijima, H., Hachiya, M., Kakizawa, J., Wen, L., Oseto, M., Morooka, K., Kurtz, J.B., 1998. Determination of serotypes of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiol. Immunol.* 42, 539–547.
- Medina, S.M., Gutierrez, M.F., Liprandi, F., Ludert, J.E., 2000. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3481–3483.
- Méndez-Toss, M., Griffin, D.D., Calva, J., Contreras, J.F., Puerto, F.I., Mota, F., Guiscafre, H., Cedillo, R., Munoz, O., Herrera, I., Lopez, S., Arias, C.F., 2004. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J. Clin. Microbiol.* 42, 151–157.
- Mitchell, D.K., Madson, D.O., Jiang, X., Berke, T., Monroe, S.S., Carter, M.J., Willcocks, M.M., Pickering, L.K., 1999. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J. Infect. Dis.* 180, 514–517.
- Monroe, S.S., Carter, M.J., Herrmann, J.E., Mitchell, D.K., Sanchez-Fauquier, A., 2005. Family Astroviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, London, pp. 859–864.
- Mustafa, H., Palombo, E.A., Bishop, R.F., 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of 4 consecutive years 1995–1998. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1058–1062.
- Noel, J.S., Lee, T.W., Kurtz, J.B., Glass, R.I., Monroe, S.S., 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 797–801.
- Palombo, E.A., Bishop, R.F., 1996. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1750–1753.
- Pang, X.L., Vesikari, T., 1999. Human astrovirus-associated gastroenteritis in children under 2 years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Acta Paediatr.* 88, 532–536.
- Sakamoto, T., Negidhi, H., Wang, Q.H., Akihara, S., Kim, B., Nishimura, S., Kaneshi, K., Nakaya, S., Ueda, Y., Sugita, K., Motohiro, T., Nishimura, T., Ushijima, H., 2000. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1–8). *J. Med. Virol.* 61, 326–331.
- Schnagl, R.D., Belfrage, K., Farrington, R., Hutchinson, K., Lewis, V., Erlich, J., Morey, F., 2002. Incidence of human astrovirus in central Australia (1995–1998) and comparison of deduced serotypes detected from 1981 to 1998. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4114–4120.
- Silva, A.M., Leite, E.G., Assis, R.M., Majerowicz, S., Leite, J.P., 2001. An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 in a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 1069–1073.
- Silva, P.A., Cardoso, D.D.P., Schreier, E., 2006. Molecular characterization of human astroviruses isolated in Brazil, including the complete sequences of astrovirus genotypes 4 and 5. *Arch. Virol.* 151, 1405–1417.
- Timenetsky, M.C.S.T., Kisielius, J.J., Grisi, S.J.F.E., Escobar, A.M.U., Ueda, M., Tanaka, H., 1993. Rotavírus, adenovírus, astrovírus, calicivírus e “small round vírus particles” em fezes de crianças, com e sem diarreia aguda, no período de 1987 a 1988, na grande São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 35, 275–280.
- Victoria, M., Carvalho-Costa, F.A., Heinemann, M.B., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., 2007. Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Virol.* 79, 939–944.
- Walter, J.E., Mitchell, D.K., Guerreiro, M.L., Berke, T., Madison, D.O., Monroe, S.S., Pickering, L.K., Ruiz-Palacios, G., 2001. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico City. *J. Infect. Dis.* 183, 681–683.
- Willcocks, M.M., Brown, T.D.K., Madeley, C.R., Carter, M.J., 1994. The complete sequence of a human astrovirus. *J. Gen. Virol.* 75, 1785–1988.

APÊNDICE D:

GABBAY YB, LINHARES AC, OLIVEIRA DS, NAKAMURA LS, MASCARENHAS JDP, GUSMÃO RHP, HEINEMANN MB, MACÊDO O, LEITE JPG. 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. Publicado na revista *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 4, p. 531-534, 2007.

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

Yvone B Gabbay/⁺, Alexandre C Linhares, Darleise S Oliveira, Lilian S Nakamura, Joana D'Arc P Mascarenhas, Rosa Helena P Gusmão*, Marcos B Heinemann**, Olinda Macêdo, José Paulo G Leite***

Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, BR 316 Km 7, s/nº, 67030-000 Ananindeua, PA, Brasil *Universidade Estadual do Pará, Belém, PA, Brasil **Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil ***Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

This study describes the genetic relationships of the first human astrovirus type-8 (HAstV-8) detected in Belém-Brazil, during a public hospital-based study. This strain was compared with other HAstV-8 strains identified elsewhere which have sequences available at GeneBank. The regions ORF1a (primers Mon348/Mon340) and ORF2 (primers Mon269/Mon270) were analyzed by nucleotide sequencing and a high similarity rate was observed among the Belém strain and other HAstV-8 strains. In ORF1a, homology values of 93-100% were detected, and in ORF2 96-99%. Considering the sequence variation (7%) observed in ORF2 region, it was suggested that HAstV-8 strains could be divided in three different lineages.

Key words: astrovirus type 8 - molecular characterization - Belém - Brazil

Human astrovirus (HAstVs) belongs to the *Astroviridae* family, and are classified in the genus *Mamastrovirus* (Monroe et al. 2005). They are small, round non-enveloped viruses, 28 nm in diameter and composed of a single-stranded positive-sense RNA genome (ssRNA). The genome contains three open reading frames (ORFs) designated ORF1a, ORF1b, and ORF2, as well as terminal non-coding regions (NCR). ORF1a and 1b encode non-structural proteins, including a serine protease (*Pro*) and RNA-dependent RNA polymerase (*Pol*), respectively, and these regions contain highly conserved sequences. ORF2 is located at the 3' end of the genome, encodes the capsid protein precursor, and is highly variable (Matsui & Greenberg 2001, Walter et al. 2001).

HAstVs were classified into eight genotypes based on the nucleotide sequence analysis of a 348-bp region of ORF2 (Mustafa et al. 2000). These eight genotypes showed good correlation with the eight serotypes determined according to the reactivity of the capsid proteins with type-specific monoclonal antibodies (Sakamoto et al. 2000, Taylor et al. 2001).

For the eight types of HAstV already reported, the HAstV-1 is considered the most prevalent and HAstV-6, 7, and 8 as the seldom detected (Mustafa et al. 2000, Guix et al. 2002, Méndez-Toss et al. 2004). After the description of the prototype HAstV-8 (Z66541) in United Kingdom in 1995, the first reports describing the detection of this type of virus relate to the occurrence of

single isolates like those occurring in Ghaza and Uganda (Monceyron et al. 1997), Pakistan (Sakamoto et al. 2000), Australia (Nadan et al. 2003) and, more recently, in the United States (acces. nos AY304469 and AY304470), Brazil (Silva et al. 2006, and acces. nos DQ381506 to DQ381508), and India (acces. nos AB116554, AB126670 to 126674, AB191789, AB194280, and AB211059). Studies conducted in Egypt, Spain, Korea, South Africa, Hungary, and Mexico demonstrated the presence of HAstV-8 in percentages that varied from 8 to 23%, considering the total of positive cases detected (Naficy et al. 2000, Guix et al. 2002, Kang et al. 2002, Nadan et al. 2003, Méndez-Toss et al. 2004, Jakob et al. 2004).

One strain of HAstV-8 (PA-NSC087-BR) was detected in Belém, North of Brazil, during a study conducted in a public hospital from November 1992 to November 1994 involving children aged 0-5 years, who were admitted with acute gastroenteritis (Gusmão et al. 1999). Such HAstV-8 isolate was obtained from a seven-month old female with acute diarrhea of four-day duration, which persisted for eight more days. Moderate dehydration was identified during the first 48 h of hospitalization. In addition, fever was recorded in the first day and acute respiratory infection was diagnosed on the second and third days of admission. A diarrheic stool sample was obtained four days after admission (March 1st, 1993), being stored at Instituto Evandro Chagas, at -20°C, until being processed.

This was the first time that a HAstV-8 was detected in Belém. Furthermore, this type has rarely been detected worldwide (Guix et al. 2002, Méndez-Toss et al. 2004), and up to now, only two studies described molecular analysis of the HAstV-8 strains (Méndez-Toss et al. 2000, Taylor et al. 2001). The aim of this report is therefore to describe the antigenic and genetic relationships of this HAstV-8 strain (PA-NSC087-BR), in light of compari-

Financial support: IEC/SVS/MS, IOC-Fiocruz, SECTAM/Funtec/PA, Pibic/CNPq

⁺Corresponding author: yvonegabbay@iec.pa.gov.br

LSN is CNPq fellowship

Received 16 January 2007

Accepted 22 March 2007

son with other HAstV-8 strains identified elsewhere, to gathering more complete characterization data on this type. This is the first approach to compare different strains of HAstV-8 already described in relation to the ORF1a and 5' end ORF2 region of the HAstV-8.

The specimens collected in this study were screened for the presence of HAstV antigen by a commercial qualitative enzyme immunoassay (EIA) kit (IDEIA™ Dako Cytomation, Ely, UK), with subsequent confirmation by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific primers Mon 269 (4526-4545 nt) and Mon 270 (4955-4974 nt), yielding an expected product size of 449 nt in the 5' end of ORF2, as described previously by Noel et al. (1995) with few modifications (Gabbay et al. 2005). The positive samples by RT-PCR were genotyped by two methodologies: the type-specific RT-PCR using primers described by Sakamoto et al. (2000), that amplified the 3' end region of ORF2, and by the nucleotide sequencing of RT-PCR astrovirus amplicons that was carried out under the conditions described by Gabbay et al. (2005), with the primers Mon 269 / Mon 270. Another pair of primers (Mon 348 / Mon 340), directed towards the ORF1a (Belliot et al. 1997), was also used with the HAstV-8 sample, to obtain data from another region of the genome, therefore broadening the phylogenetic analysis. Sequence data obtained with sample PA-NSC087-BR with primers Mon 269 / Mon 270 were aligned and edited using BioEdit Sequence Alignment Editor (v.7.0.5.2) program and compared with the eight prototype sequences (HAstV1 [L23513], HAstV2 [L13745], HAstV3 [L38505], HAstV4 [L38506], HAstV5 [U15136], HAstV6 [L38507] and HAstV7 [L38508], Oxford reference strains and HAstV-8 [Z66541], United Kingdom reference) and with the strains Yuc-8 (AF260508), AS20 (AF292079), Melb8A (AF175261), RJ8398/BR/04 (DQ381508), Bcn8-5 (AF34880), BrG8 (DQ139832) and RJ8163/BR/04 (DQ381507) obtained from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), using the BLAST program. The sequence data obtained with sample PA-NSC087-BR with primers Mon 340 / Mon 348 were aligned with the sequences AS20 (AF290509), KS106205 (AF361030), KS106207 (AF361032), HAstV-2 (L13745), BrG5 (DQ028633), HAstV-3 (AF141381), HAstV-1 (L23513), BrG4 (DQ070852), V770/2002 (AB126670), I/V813/2002 (AB126672), Yuc-8 (AF260508), HAstV-6 (AF290507), HAstV-7 (AF290508). Phylogenetic trees were constructed by neighbor-joining method using the Mega (v. 3.1) software, supported by bootstrap using 2000 replicates. The nucleotide sequences determined in this study have been deposited in the GenBank database and assigned the accession numbers DQ990460 and DQ990461.

All the specimens of this study were tested for the presence of bacteria and parasites following the specifications of the "WHO Manual for Laboratory Investigation of Acute Enteric Infections, Programme for Control of Diarrhoeal Diseases". Samples were also tested for rotavirus antigen using a commercial EIA (DAKO-PATTS EIA kits-Copenhagen, Denmark), and for calicivirus using the RT-PCR technique including a pair of primers p289 and p290 as described by Jiang et al. (1992).

After the detection of HAstV by both EIA and RT-

PCR, the sample PA-NSC087-BR was tested by the type-specific PCR that assigned this sample as a HAstV-8. Nucleotide sequence analyses using the pair of primers Mon 269/Mon 270 and Mon 340/Mon 348 confirmed this strain as belonging to genotype 8. A good correlation between these two methodologies was also demonstrated in studies conducted in a periurban community of Mexico City and Hungary for all genotypes (Walter et al. 2001, Jakab et al. 2004).

Phylogenetic trees based on the 348-bp fragment of the ORF2 region (Fig. 1A) and on the 246-bp fragment of the ORF1a region (Fig. 1B) were constructed to assess the genetic relatedness between the PA-NSC087-BR strain and other available sequences of HAstV-8 obtained from different countries.

Analysis of the ORF1a region showed that PA-NSC087-BR group together with the other HAstV-8 genotypes as well as with genotypes HAstV-1 to HAstV-5 in a genogroup A, as defined by Belliot et al. (1997) and Taylor et al. (2001). Comparing the strain PA-NSC087-BR with the strain Yuc-8, a 97% nt and a 100% aa similarities were observed. With the other HAstV-8 (AS20, KS106205, KS106207, and V813/2002) the similarities were 93-94% at nt level and 96-99% at aa level. In one HAstV-8 sample from India (V770/2000), the sequence described in GeneBank for ORF1a region was a little small (220 bp), and when it was compared with the strain PA-NSC087-BR a similarity of 93% in nt and of 98% in aa was seen. The comparison of the strain PA-NSC087-BR with the strain classified as HAstV-1, 2, 3, 4, and 5 showed significant homology (90-93% in nt and 96-97% in aa), in contrast with HAstV types 6 and 7 where similarity was lower (80% nt and 92-95% aa).

As previously demonstrated (Belliot et al. 1997, Taylor et al. 2001), the nucleotide sequence analysis of ORF1a region from HAstV-1 to HAstV-8 indicate that HAstVs fall into two distinct genogroups. This fact was also observed in this study however, we did not verify a high similarity between HAstV-8 and HAstV-4 strains, as reported by Taylor et al. (2001). This may be explained by the fact that HAstV-4 strain used in our analysis was different from that utilized in that research.

Considering the amino acid sequence of the ORF1a region, the strain PA-NSC087-BR demonstrated a pattern similar to that of strain Yuc-8, and a difference of one (V770/2002 and V834/2000), two (AS20 and KS106207), and three (KS106205) amino acids as compared to other strains sequenced (Fig. 2A).

Analysis of the ORF2 region indicates that PA-NSC087-BR strain has a higher pairwise similarity with the strain SXPAS706 (99% in nt), and with the other strains (Yuc-8, AS20, RJ8398, Bcn8-5, BrG8, Melb8A), of 96-98% in nt. A divergence of 6% in nt sequence was noted in relation to the HAstV-8 prototype, and of 7% with the HAstV-8 strain RJ8163. Based on the sequence variations observed among strains of a same type, some authors (Medina et al. 2000, Guix et al. 2002) have proposed that strains showing a sequence diversity of at least 7% could be classified as new lineages. Using this same criterion, we observed, as for the ORF2 region, HAstV-8 could be divided in three different lineages and two of these were detected in Brazil (Fig. 1A).

acids was observed (Fig. 2B). The strains Melb8A and RJ8163 showed a difference to the prototype of 9 and 19 amino acids, respectively. This clearly demonstrated the great difference between the prototype and the other type 8 strains circulating worldwide and sustains the classification of this type into three lineages. The significant correlation (97 to 99%) observed between the strain detected in Belém and other from various countries (Pakistan, Mexico, South Africa, Spain, and Brazil), suggests that a genetically similar HAstV-8 strain was circulating in these several countries.

No other enteropathogen was detected in the PANSC087-BR sample, suggesting that astrovirus had a role in the etiology of diarrhea. Of note, the clinical course appeared to be more severe than it has previously been appreciated (Nadan et al. 2003).

We cannot rule out the possibility of a nosocomial infection since the fecal sample of this child was obtained four days after admission; however, there is a strong evidence of community-acquired infection because we had a single HAstV-8 detection into the ward environment. It is important to mention that during this study a total of 372 specimens were tested yielding an astrovirus positivity of 8.9% (33/372), and with the detection of three HAstV-1 nosocomial infections.

In summary, we characterized the first case of HAstV-8 isolate in Belém, Brazil, emphasizing that comparison of sequences obtained from the ORF2 region allowed us to sustain the existence of three distinct lineages within HAstV-8.

ACKNOWLEDGMENTS

To the valuable technical support provided by Maria Silvia de Lucena.

REFERENCES

- Belliot G, Laveran H, Monroe SS 1997. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch Virol* 142: 1323-1334.
- Gabbay YB, Luz CRNE, Costa IV, Cavalcante-Pepino EL, Sousa MS, Oliveira KK, Wanzeller ALM, Mascarenhas JDP, Leite JPG, Linhares AC 2005. Prevalence and genetic diversity of astrovirus in children with and without diarrhea in São Luís, Maranhão, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 709-714.
- Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolome R, Latorre C, Rabella N, Simo M, Bosch A, Pinto M 2002. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol* 40: 133-139.
- Gusmão RHP, Mascarenhas JDP, Gabbay YB, Lins-Laison ZC, Ramos FLP, Monteiro TAF, Valente SA, Fagundes-Neto U, Linhares AC 1999. Rotavirus subgroups, G serotypes, and electrophoretotypes in cases of nosocomial infantile diarrhoea in Belém, Brazil. *J Trop Pediat* 45: 81-86.
- Jakab F, Meleg E, Bányai K, Meleg B, Tímár L, Péterfai J, Szűcs G 2004. One-year survey of astrovirus infection in children with gastroenteritis in a large hospital in Hungary: occurrence and genetic analysis of astroviruses. *J Med Virol* 74: 71-77.
- Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK 1992. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 2529-2534.
- Kang Y-H, Park Y-K, Ahn J-B, Yeun J-D, Jee Y-M 2002. Identification of human astrovirus infections from stool samples with diarrhea in Korea. *Arch Virol* 147: 1821-1827.
- Matsui SM, Greenberg HB 2001. Astroviruses. In DM Knipe, PM Howley (eds), *Fields Virology*, 4th ed., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 875-893.
- Medina SM, Guitierrez MF, Liprandi F, Ludert JE 2000. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. *J Clin Microbiol* 38: 3481-3483.
- Méndez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, Guiscafre H, Cedillo R, Munoz O, Herrera I, Lopez S, Arias CF 2004. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J Clin Microbiol* 42: 151-157.
- Méndez-Toss M, Romero-Guido P, Munguía ME, Méndez E 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *J Gen Virol* 81: 2891-2897.
- Monceyron C, Grinde B, Jonassen TØ 1997. Molecular characterization of the 3'-end of the astrovirus genome. *Arch Virol* 142: 699-706.
- Monroe SS, Carter MJ, Herrmann JE, Mitchell DK, Sanchez-Fauquier A 2005. Family *Astroviridae*. In CM Fauquet, MA Mayo, J Maniloff, U Desselberger, LA Ball (eds), *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier/Academic Press, London, p. 859-864.
- Mustafa H, Palombo EA, Bishop RF 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J Clin Microbiol* 38: 1058-1062.
- Nadan S, Walter JE, Grabow WOK, Mitchell DK, Taylor MB 2003. Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. *Appl Environ Microbiol* 69: 747-753.
- Naficy AB, Rao MR, Holmes JL, Abu-Elyazeed R, Savarino SJ, Wierzbica TF, Frenck RW, Monroe SS, Glass RI, Clements JD 2000. Astrovirus diarrhea in Egyptian. *J Infect Dis* 182: 685-690.
- Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 33: 797-801.
- Sakamoto T, Negidhi H, Wang QH, Akihara S, Kim B, Nishimura S, Kaneshi K, Nakaya S, Ueda Y, Sugita K, Motohiro T, Nishimura T, Ushijima H 2000. 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* 61: 326-331.
- Silva PA, Cardoso DDP, Schreier E 2006. Molecular characterization of human astroviruses isolated in Brazil, including the complete sequences of astrovirus genotypes 4 and 5. *Arch Virol* 151: 1405-1417.
- Taylor MB, Walter J, Berke T, Cubitt WD, Michell DK, Matson DO 2001. Characterization of a South African human astrovirus as type 8 by antigenic and genetic analyses. *J Med Virol* 64: 256-261.
- Walter JE, Mitchell DK, Guerreiro ML, Berke T, Madison DO, Monroe SS, Pickering LK, Ruiz-Palacios G 2001. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico city. *J Infect Dis* 183: 681-683.

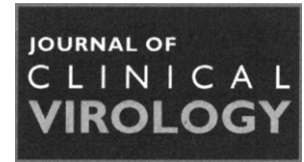
APÊNDICE E:

GABBAY YB, CHAMONE CB, NAKAMURA LS, OLIVEIRA DS, ABREU SF, CAVALCANTE-PEPINO EL, MASCARENHAS JDP, LEITE JPG, LINHARES AC. Characterization of an astrovirus genotype 2 strain causing an extensive outbreak of gastroenteritis among Maxakali Indians, Southeast Brazil. Publicado na revista *Journal of Clinical Virology*, v. 37, p. 287-292, 2006.



ELSEVIER

Journal of Clinical Virology 37 (2006) 287–292



www.elsevier.com/locate/jcv

Characterization of an astrovirus genotype 2 strain causing an extensive outbreak of gastroenteritis among Maxakali Indians, Southeast Brazil

Yvone Benchimol Gabbay^{a,*}, Chequer Buffe Chamone^b, Lilianny Satiko Nakamura^a, Darleise Souza Oliveira^a, Simone Faria de Abreu^c, Elielma Lira Cavalcante-Pepino^a, Joana D'Arc Pereira Mascarenhas^a, José Paulo Gagliardi Leite^d, Alexandre Costa Linhares^a

^a Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas (IEC), Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Belém, Pará, Brazil

^b Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças, Instituto Octávio Magalhães – LACEN-MG, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Coordenação do Programa de Saúde Indígena de Minas Gerais, Secretaria de Estado da Saúde Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^d Laboratório de Virologia Comparada, Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 10 May 2006; received in revised form 14 August 2006; accepted 17 August 2006

Abstract

Background: Human astroviruses (HAstVs) are a common cause of sporadic diarrhea in children but large outbreaks occur in children's day care centers, schools and in homes for the elderly.

Objectives: To report a large outbreak of acute gastroenteritis that occurred in January 2004 among Indians from the Maxakali Reserve in the State of Minas Gerais, Brazil.

Study design: Fecal samples from 46 Maxakali patients were collected and tested for a range of enteric pathogens. HAstVs was detected by EIA and strains were confirmed by RT-PCR and typed by direct sequencing. Clinical information was collected.

Results: The illness which affected more than 100 children under 6 years of age was characterized by watery diarrhea, fever and vomiting. HAstV-2 was the sole enteropathogen detected in 26 (56%) of 46 samples analyzed by EIA and/or RT-PCR. The 17 positive samples sequenced were identical in a 348 bp region used for phylogenetic analysis and were classified as genotype 2.

Conclusions: This is the first description of an outbreak of HAstV-2 gastroenteritis in a population of Brazilian Indians. The magnitude of the outbreak and the severity of the disease underscore the need to better understand the epidemiology of astrovirus and other enteric agents in these populations.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Human astrovirus (HAstV); Genotype 2; Outbreak; Indian; Brazil

1. Introduction

Human astroviruses (HAstVs) belong to the *Astroviridae* family, are non-enveloped, single-stranded, positive-sense

Abbreviations: EIA, enzyme immunoassay; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; RNA, ribonucleic acid; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; ORF2, open reading frame; NLV, Norwalk-like virus; SLV, Sapporo-like virus

* Correspondence to: Virology Section, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Rodovia BR 316-Km 07, S/N, Levilândia, 67030-000, Ananindeua, Pará, Brazil. Tel.: +55 91 32142015; fax: +55 91 32142005.

E-mail address: yvonegabbay@iec.pa.gov.br (Y.B. Gabbay).

RNA viruses (Matsui and Greenberg, 2001). Recent studies confirmed HAstVs as a worldwide cause of diarrhea, mainly among young children who sought medical care as outpatients or as inpatients (Bereciartu et al., 2002; Cunliffe et al., 2002; Dalton et al., 2002). Large outbreaks of gastroenteritis associated with HAstV infection have been reported in children's day care centers and schools (Mitchell et al., 1995; Oishi et al., 1994), as well as in elderly homes (Gray et al., 1987). HAstV infections generally result in disease with low severity, but usually a high number of children are affected (Marie-Cardine et al., 2002). The severity of HAstV infection in relation to the genotype has not been fully elucidated. Type1 is the most prevalent type identified worldwide

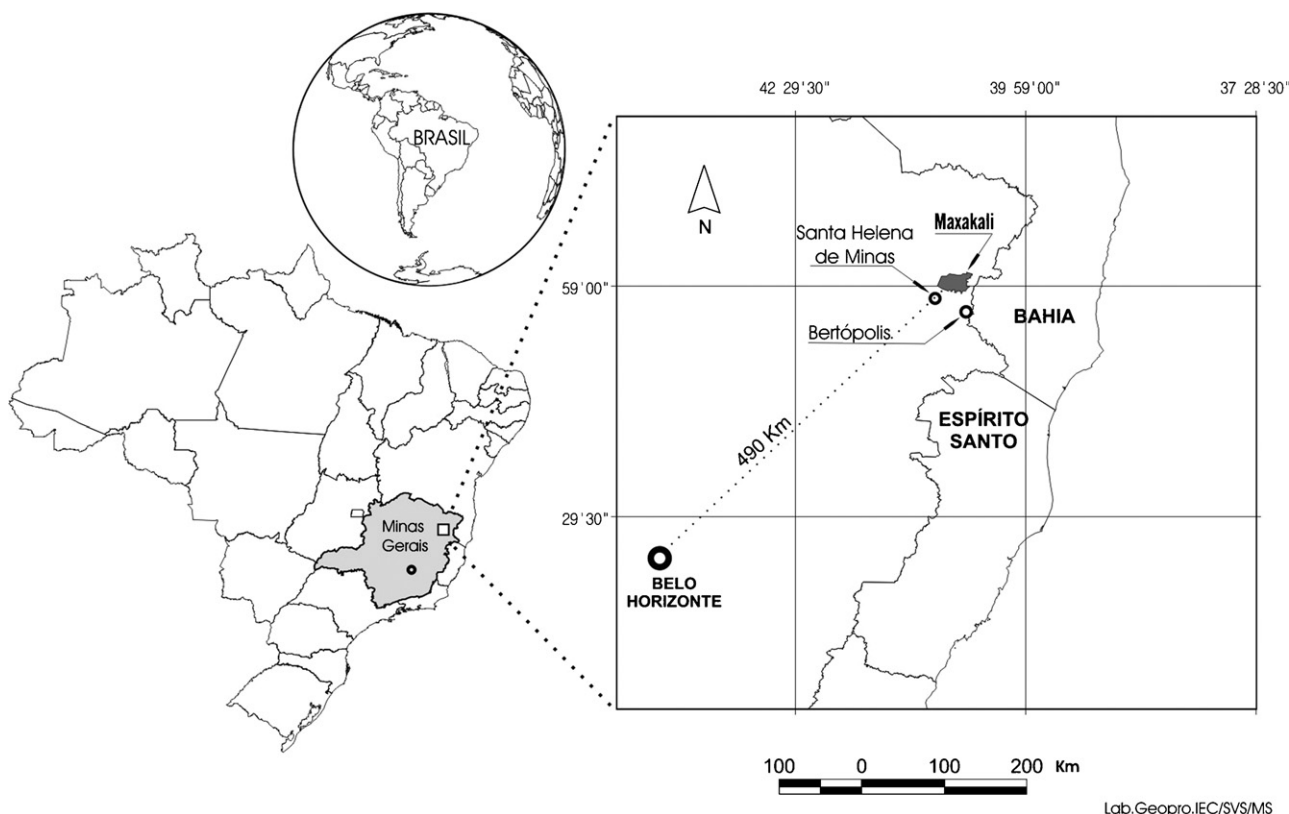


Fig. 1. Map of the State of Minas Gerais, Brazil, showing the location of the Maxakali Reserve.

(Méndez-Toss et al., 2004), although detection of the other types is increasing, mainly due to the emergence of new types and improvement of the methodologies employed (Glass et al., 1996). Mixed infections involving HAsV, rotavirus, norovirus and adenovirus are often seen (Méndez-Toss et al., 2004). These co-infections make the clinical evaluation of HAsV disease more difficult.

In this report, we discuss the association of HAsV genotype 2 (HAsV-2) with an extensive outbreak of acute gastroenteritis that occurred in January 2004 among Indian in the Maxakali Reserve, located in the State of Minas Gerais (MG) in Southeast Brazil. Partial nucleotide sequences of the ORF2 region of the HAsV-2 causing in this outbreak were compared with the prototype strain and others from different localities in order to determine possible genetic differences.

2. Materials and methods

2.1. Patients

The Maxakali Reserve is located at the Macuri valley, Northeast of MG State, in the region of Rio Itanhém's headboards, between the districts of Santa Helena de Minas and Bertópolis, near the border of Bahia State (Fig. 1).

The Maxakali Indians belong to the Macro-gê linguistic group (Campos, 2000). During the outbreak, there were

1220 Indians living in two village sites: 720 belonged to the "Água Boa" area and 500 to the "Pradinho" area. The distance between "Água Boa" and "Pradinho" is approximately 12 km. "Água Boa" occupies an area of 2412 ha, being composed of seven neighboring small villages. The area of "Pradinho" is 1864 ha, with eight neighboring small villages.

There is a daily contact between these Indians and the urban communities, mainly via a road that crosses the indigenous lands to provide access to different districts and farms located in this region. Indians travel to these cities daily to sell their products.

During January 2004, an outbreak of acute gastroenteritis occurred among 117 Indians of the Maxakali Reserve, involving both "Água Boa" and "Pradinho" with similar intensity and affecting mainly infants and children aged 0–6 years.

Forty-six fecal samples were sent to "Instituto Evandro Chagas-SVS" Ananindeua, Pará, where they were stored at -20°C until processed for presence of enteric viruses.

2.2. Virus detection methods

Fecal samples were tested using a commercial qualitative EIA kit for rotavirus group A and adenovirus antigens (Premier-Rotaclone™ and Adenoclone™, Meridian Bioscience Inc., OH, USA, respectively), and astrovirus antigen (IDEIA™ Astrovirus, DakoCytomation, Ely, UK). Stool suspensions were also used for RNA extraction by the glass

powder method (Boom et al., 1990) followed by a conventional PAGE to detect possible rotavirus RNA segments. An RT-PCR, using the extracted viral RNA, was performed with primers (Mon 269 and Mon 270- Eurogentec Bel S.A) targeted to the ORF2 region of astrovirus, using amplification conditions described by Noel et al. (1995) except for reverse transcription, where a random hexamer [pd (N)₆ -50 A₂₆₀ units- Amersham Biosciences, Town, USA] was used. Samples yielding an amplicon of 449 bp were considered positive.

For norovirus investigation, we used primers p289 and p290 described by Jiang et al. (1999). The RT-PCR was performed using the same methodology used for HAstV with a double amount of RNA. Samples showing amplicons of 319 and 331 bp were considered positive for Norwalk-like virus (NLV) and Sapporo-like virus (SLV), respectively.

2.3. Genetic characterization of astrovirus strains

HAstV positive samples were sequenced using the ConcertTM Rapid Gel Extraction System (Invitrogen, Town, USA) for purification of the amplicons, and the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA) with the primers Mon 269 and Mon 270. Analysis of the products utilized an automated ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Sequence data from both strands were aligned and edited in the BioEdit Sequence Alignment Editor (v. 6.0) program and compared with eight prototype sequences: HAstV-1 (L23513), HAstV-2 (L13745), HAstV-3 (L38505), HAstV-4 (L38506), HAstV-5 (U15136), HAstV-6 (L38507), HAstV-7 (L38508) and HAstV-8 (Z66541) reference, obtained from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). The dendrogram was constructed by the neighbor-joining method using the MEGA (v. 3.1) software (Kumar et al., 2004), supported by bootstrap procedures using over 2000 replicates. Sequences determined in this study were submitted to the GenBank with the accession numbers: DQ322255–DQ322271.

3. Results

From 46 samples analyzed by the EIA, 11 (24%) were positive for HAstV, two (4%) for non-enteric adenovirus, and all were negative for rotavirus. RT-PCR was performed for HAstV and norovirus in all 46 specimens, 56% (26/46) of which were positive for HAstV, and none for norovirus. Eleven samples were positive by EIA and RT-PCR for HAstV, while 15 were positive by RT-PCR alone. Mixed infection involving astrovirus and non-enteric adenovirus was observed in one patient.

Seventeen of 26 RT-PCR HAstV positive samples, which yielded clear strong amplicons at RT-PCR were sequenced. All were classified as genotype 2 (Fig. 2). All isolates were identical in the 348 bp region used for the phylogenetic analysis. The divergence in the nucleotide sequence between these samples and the prototype genotype 2 strain (L13745) was

7.8%. As shown in the phylogenetic tree (Fig. 2), when these samples were compared with other genotype 2 strains, from studies conducted in Belém, Pará, Brazil, during several years and involving various groups at community – and – hospital environments, divergences ranging from 7.7% to 9.1% were observed. A HAstV-2 strain from São Luis, Maranhão, Brazil showed a divergence of 9.9%. Considering the amino acid sequence, a variation of 0.8% was found when comparing the Maxakali outbreak samples to both the prototype strain and samples from Belém (data not shown).

Deduced amino acid sequences showed a single change at number 113 (Lys → Arg) in the study strains compared with the prototype strain (data not shown).

Health officials at the Maxakali Reserve reported that most of the sick Indians developed watery diarrhea, fever and vomiting. Malnutrition was diagnosed in several children which may have accounted for exacerbation of the symptoms. Overall, 117 children under 6 years old became ill, of whom 27 (23%) required hospitalization due to serious dehydration. The rotavirus-negative results suggest that HAstV-2 itself caused these severe gastroenteritis cases. Three deaths occurred during the outbreak. However, there was insufficient data to establish a causal relationship between these deaths and HAstV infections.

4. Discussion

Diarrhea outbreaks caused by HAstV have been reported involving children at day care centers (Mitchell et al., 1995) or elderly people (Lewis et al., 1989). The present report provides the first description of a gastroenteritis outbreak associated with HAstV-2 in an Indian population. HAstV was detected in 56% of gastroenteritis cases. The use of specific EIA and RT-PCR assays increased the detection of this HAstV (Glass et al., 1996).

Three outbreaks involving HAstV-2 were described by Mitchell et al. (1999) in children who attended child care centers in Norfolk, Virginia. Surveillance studies conducted at a hospital in Melbourne, Australia (Mustafa et al., 2000) and in emergency rooms in Bogota, Colombia (Medina et al., 2000), also demonstrated the presence of HAstV-2. In comparing sequences of Australian and Colombian HAstV-2 strains with those obtained during the Maxakali outbreak (see Fig. 2), divergence rates in the nucleotide sequences of 15.9% and 7.7%, respectively, were observed.

In Brazil, HAstV has been reported to cause two outbreaks: one in São Paulo, which was interfamilial (Tanaka et al., 1994), and another in a day care center in Rio de Janeiro (Silva et al., 2001). The latter outbreak was caused by type 1. In Goiânia, Goiás, among children up to 2 years of age, hospitalized with acute gastroenteritis, HAstV was detected in 2.8% of patients, all being genotyped as HAstV-1 (Cardoso et al., 2002).

Another diarrhea outbreak involving a remote community was described in Brazil among the Tiriyo Indians who

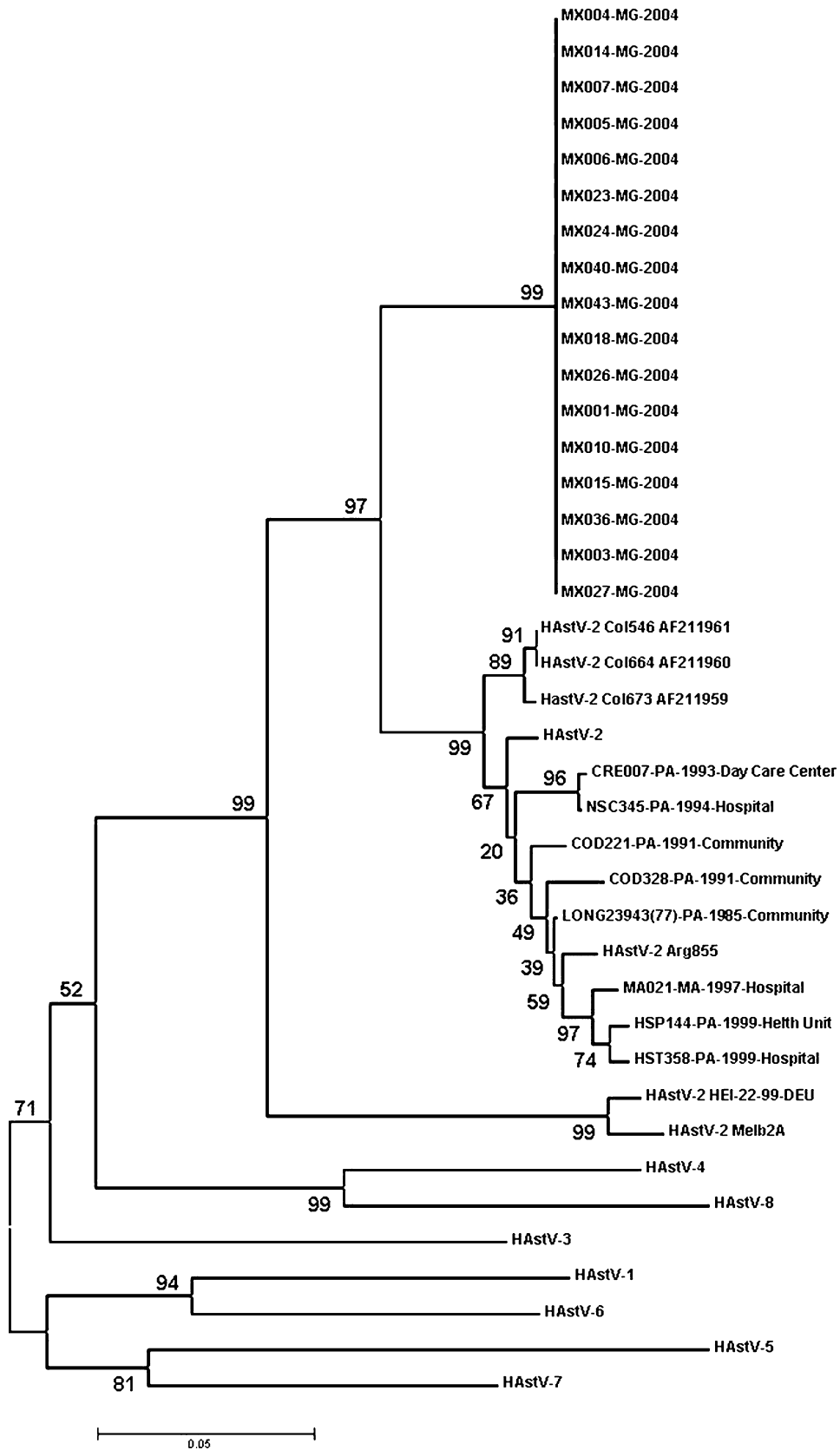


Fig. 2. Phylogenetic tree of a 348-bp ORF2 region of HAstV involving strains from the Maxakali Indians (MX), Belém-Pará (PA), São Luís-Maranhão (MA), other localities and the standard human HAstV strains (HAstV-1–HAstV-8) isolated in the United Kingdom. The scale bar represents a genetic distance of 2%. The sequences were obtained from the GenBank database with the accession numbers listed in Section 2.

live in the North of Pará state. This outbreak was, however, associated with rotavirus and all age-groups were affected, and the proportion of symptomatic infection was greater in young children, with most of severe cases and one death occurring in infants less than 1 year old (Linhares et al., 1981). No data on HAstV infection is available from this outbreak.

The prevalence of HAstV gastroenteritis in the Maxakali Indians, as determined by EIA was 24%, but increased to 56% when samples were tested by RT-PCR, indicating that RT-PCR is more sensitive than EIA. This is in accordance with results obtained elsewhere where RT-PCR detected HAstV in 22% more stool specimens than EIA (Mitchell et al., 1995). The greater sensitivity of RT-PCR was also observed among children monitored for diarrhea in Mexico City (Walter et al., 2001).

The 17 samples sequenced from the Maxakali outbreak were identical for both nucleotide and amino acid sequences. Several nucleotide differences were observed in the type 2 strains when compared to the prototype 2 strain. All of these were silent with respect to amino acid coding with the exception of one change at amino acid 113 (Lys → Arg).

Both areas (“Água Boa” and “Pradinho”) were affected by acute gastroenteritis with the same intensity. The close contact of Indians with urban areas and poor hygienic conditions probably accounted for the introduction and spread of HAstV in these tribes. Furthermore, heavy downpours during the time of the outbreak, leading to frequent gathering of the Indians, mainly children, may have enhanced person-to-person transmission. Of note, the water used for consumption during the outbreak was examined for the presence of bacteria and found to be inappropriate for consumption.

The extensive outbreak among the Maxakali Indians underscores the need for establishing a nationwide surveillance network in Brazil, including remote communities, to assess the burden of rotavirus and other enteric viruses such as HAstV and norovirus.

Acknowledgements

We want to thank Dr. Gilberta Bensabath, Dr. Olinda Macedo, Dr. Nelson Veiga Gonçalves, Dr. Manoel C. Soares, Dr. Maria de Lourdes C. Gomes, Antonia Alves, Maria Silvia de Lucena, Maria das Graças Ferreira and Antônio de Moura, of IEC/SVS/MS, for their technical assistance. Thanks are also due to the medical team of the Indigenous Special Sanitary Districts of MG and Espírito Santo, and to the technicians of the Epidemiological Surveillances of the Health Secretary of the State of MG and of the Health Regional Management of Teófilo Otoni, MG that had contributed to the investigation and prevention measures during the gastroenteritis outbreak in the Maxakali Reserve. This work received financial support from IEC-SVS, FUNTEC/PA, CNPq and FIOCRUZ.

References

- Bereciartu A, Bok K, Gomes J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Virol* 2002;25:197–203.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;28:495–503.
- Campos RC. Movimentos indígenas por educação: novos sujeitos socio-culturais na história recente do Brasil. 23^a Reunião Anual da ANPED (Associação Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Educação), Caxambu, São Paulo, 2000.
- Cardoso DDP, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Martins RMB, Leite JPG. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiânia, Goiás, Brazil. *Med Sci Monit* 2002;8(9):CR624–8.
- Cunliffe NA, Dove W, Gondwe JS, Thindwa BD, Greensill J, Holmes JL, Breses 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(4):563–6.
- Dalton RM, Roman ER, Nagredo AA, Wilhelmi ID, Glass RI, Sanchez-Fanquier A. Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:1038–41.
- Glass RI, Noel JS, Mitchell D, Herrmann JE, Blacklow NR, Pickering LK, Dennehy P, Ruiz-Palacios G, De Guerreiro ML, Monroe SS. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch Virol* 1996;12:287–300.
- Gray JJ, Wreghitt TG, Cubitt WD, Elliot PR. An outbreak of gastroenteritis in a home for elderly associated with astrovirus type 1 and human calicivirus. *J Med Virol* 1987;23:377–81.
- Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. Design and evolution of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like calicivirus by RT-PCR. *J Virol Methods* 1999;83:145–54.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004;5:150–63.
- Lewis DC, Lightfoot NF, Cubitt WD, Wilson SA. Outbreaks of astrovirus type 1 and rotavirus gastroenteritis in a geriatric inpatient population. *J Hosp Infect* 1989;14:9–14.
- Linhares AC, Pinheiro FP, Freitas RB, Gabbay YB, Shirley JA, Beards GM. An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune, isolated South American Indian Community. *Am J Epidemiol* 1981;113:703–10.
- Marie-Cardine A, Gourlain 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;34:1170–8.
- Matsui SM, Greenberg HB. Astroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins; 2001. p. 875–93.
- Medina SM, Gutierrez MF, Liprandi F, Ludert JE. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. *J Clin Microbiol* 2000;38:3481–3.
- Méndez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, Guiscafre H, Cedillo R, Munoz O, Herrera I, Lopez 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.
- Mitchell DK, Monroe SS, Jiang X, Matson DO, Glass RI, Pickering LK. Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1995;172:1437–44.
- Mitchell DK, Madson DO, Jiang X, Berke T, Monroe SS, Carter MJ, Willcocks MM, Pickering LK. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. *J Infect Dis* 1999;180:514–7.
- Mustafa H, Palombo EA, Bishop RF. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne,

- Australia, over a period of four consecutive years 1995–1998. *J Clin Microbiol* 2000;38:1058–62.
- 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.
- Oishi I, Yamazaki K, Kimoto T, Minekawa Y, Utagawa E, Yamazaki S, Inouye S, Grohmann GS, Monroe SS, Stine SE, Carcamo C, Ando T, Glass RI. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *J Infect Dis* 1994;170:439–43.
- Silva AM, Leite EG, Assis RM, Majerowicz S, Leite JPG. An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 in a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:1069–73.
- Tanaka H, Kisielius J, Ueda M, Glass RI, Joazeiro PP. Intrafamilial outbreak of astrovirus gastroenteritis in São Paulo, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* 1994;12:219–21.
- Walter JE, Mitchell DK, Guerreiro ML, Berke T, Madison DO, Monroe SS, Pickering LK, Ruiz-Palacios G. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico city. *J Infect Dis* 2001;183:681–3.

ANEXO

ANEXO: Documento de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos do Instituto Evandro Chagas.



Belém, 12 de maio de 2004.

Protocolo CEP/IEC - Nº 006/2003

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto: “Prevalência e caracterização genotípica de astrovirus em Populações selecionadas de Belém- Pará, no período de 1982 a 2000”

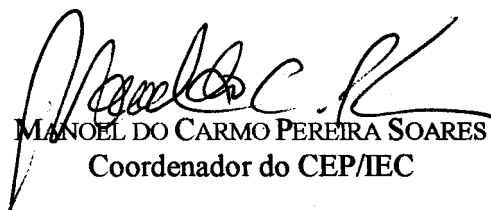
Pesquisador Responsável: YVONE GABBAY MENDES

Conforme decisão “*and referendum*” do Coordenador do CEP/IEC, o projeto em questão foi considerado **aprovado**.

Recomenda-se ao coordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preenchidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Relatório Final - deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.



MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC

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](#)