



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE  
PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
TROPICAL**

**RUI GILBERTO FERREIRA**

**DETECÇÃO DE VÍRUS GASTROENTÉRICOS EM  
MULHERES EM GOIÂNIA – GOIÁS**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical, na área de concentração de Doenças Infecciosas e Parasitárias.*

**Orientadora: Profª Dra. Divina das Dôres de Paula Cardoso**

**Goiânia  
2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**(GPT/BC/UFG)**

Ferreira, Rui Gilberto.

F383d Detecção de vírus gastroentéricos em mulheres em Goiânia -  
Goiás [manuscrito] / Rui Gilberto Ferreira. – 2009.  
xvi,124f. : il., tabs., figs., qds.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Divina das Dores de Paula Cardoso.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Patologia Tropical e Saúde Pública, 2009.

Bibliografia: f. 98-120

Inclui lista de siglas e abreviaturas, quadros e tabelas e de figuras.  
Anexo.

1. Gastroenterite viral – Mulheres – Goiânia(GO) 2. Rotavirus  
3. Adenovirus 4. Astrovirus 5. Calicivírus I. Cardoso, Divina das  
Dores de Paula II. Universidade Federal de Goiás, **Instituto de  
Patologia Tropical e Saúde Pública** III. Título.

CDU: 616.34-002-055.2(817.3)

# DEDICATÓRIA

*Aos meus amados pais e irmã, **Antônio, Maria de Lourdes e Ruth**, que sempre me incentivaram com muito amor e compreensão.*

*À minha esposa e filhas: **Paula, Sarah e Luísa** pelo carinho e estímulo de cada dia*

# **AGRADECIMENTOS**

Às **Prof<sup>ª</sup> Dra Divina das Dôres de Paula Cardoso** mais que orientadora, amiga.

Aos Professores e colaboradores do Laboratório de Virologia do IPTSP da UFG, em especial a **Ana Maria Tavares Borges; Fabiola Souza Fiaccadore, Menira Borges de Lima Dias e Souza e Rodrigo Alessandro Togo Santos** pela atenção dispensada e orientação durante a realização deste trabalho.

À todas as **pacientes** que participaram deste estudo, pela receptividade e colaboração com a pesquisa.

À **coordenação e professores** do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical pela seriedade e dedicação à pesquisa.

À **Kariny Vieira Soares e José Clementino de Oliveira Neto** pela atenção e cordialidade.

Com relação à análise estatística agradeço à **Andréia Pereira Dias de Freitas** e ao **Prof. Gercino Monteiro Filho**, pela disponibilidade, carinho e paciência durante a elaboração desta tese.

# Sumário

<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>Vii</b>
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS.....</b>	<b>Vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>Xii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>Vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>lx</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1 Rotavírus.....	24
2.1.1 Classificação taxonômica .....	15
2.1.2 Características da partícula viral .....	16
2.1.3 Manifestações clínicas .....	18
2.1.4 Epidemiologia .....	18
2.1.5 Diagnóstico laboratorial .....	19
2.1.6 Imunidade .....	21
2.1.7 Tratamento e prevenção .....	21
2.2 Adenovírus .....	23
2.2.1 Classificação taxonômica .....	33
2.2.2 Características da partícula viral .....	26
2.2.3 Patogenia e manifestações clínicas.....	24
2.2.4 Imunidade e epidemiologia .....	25
2.2.5 Diagnóstico laboratorial .....	25
2.2.5.1 Detecção viral .....	26
2.2.6 Tratamento e controle .....	26
2.3 Astrovírus .....	26
2.3.1 Histórico .....	39
2.2.2 Classificação taxonômica .....	40
2.3.3 Característica da partícula viral .....	27
2.3.4 Patogenia e manifestações clínicas .....	29
2.3.5 Diagnóstico laboratorial .....	31
2.3.6 Epidemiologia .....	33
2.3.7 Imunidade .....	36

2.3.8 Tratamento, prevenção e controle .....	36
2.4 Calicivírus .....	51
2.4.1 Histórico .....	51
2.4.2 Classificação taxonômica .....	52
2.4.3 Característica da partícula viral.....	26
2.4.4 Patogenia e manifestações clínicas .....	55
2.4.5 Epidemiologia .....	44
2.4.6 Diagnóstico laboratorial .....	46
2.4.7 Prevenção e controle .....	49
<b>3. JUSTIFICATIVAS .....</b>	<b>52</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>54</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>56</b>
5.1 População estudada .....	26
5.2 Coleta das amostras fecais .....	26
5.3 Metodologia de identificação e caracterização genômica .....	26
5.3.1 Preparo das suspensões fecais .....	58
5.3.2 Detecção de rotavírus A .....	58
5.3.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	26
5.3.2.2 Ensaio imunoenzimático .....	26
5.3.3 Detecção de adenovírus .....	60
5.3.4 Detecção de astrovírus .....	60
5.3.5 Genotipagem de astrovírus humanos .....	63
5.3.6 Detecção de calicivírus .....	66
5.4 Análise do tamanho da amostra .....	58
5.5 Análise Estatística .....	58
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>68</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>85</b>
<b>10. ANEXO .....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa – Aminoácidos

AdV – Adenovírus

AdVH – Adenovírus humano

ATP – Adenosina trifosfato

A -549 – Células de carcinoma de pulmão humano

C – Citosina

CaCo2 – Células de carcinoma de cólon humano

Core – Cerne

Da – Dalton

DBP – *DNA Binding Protein* (Proteína de ligação ao DNA)

DEPC - *diethyl pyrocarbonate* (dietil pirocarbonato)

DLP – *Double-Layered Particles* (Partícula viral de dupla camada)

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade Óptica

dNTP – Desoxirribonucléico trifosfato

dsDNA – DNA fita dupla

dsRNA – RNA fita dupla

Ead – *Enteric adenovirus* (Adenovírus entérico)

ELISA – *Enzyme linked immuno sorbent assay* (Teste imunoenzimático)

EUA – Estados Unidos da America

ECP – *Efeito citopático*

*EGPA* – Eletroforese em gel de poliacrilamida

*eIF* – *Eukaryotic initiation factor* (Fator de iniciação eucariótica)

EIE – Ensaio imunoenzimático

FC – Fixação de complemento

g – Grama

°C – Graus Celsius

G – Guanina

GTP – Guanina trifosfato

HAstV – Astrovírus humano

HC-UFG – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás

HDF – Células diplóide de fibroblasto de embrião humano

HEK – Células de rim de embrião humano

HEK-293 – Células de rim de embrião humano transformadas com DNA de AdVH5

HeLa – Células de carcinoma de cérvix uterino

HEp-2 – Células de carcinoma epidermóide de laringe humana

HI – Inibição de hemaglutinação

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HT-29 – Células de adenocarcinoma de cólon humano

HuCV - calicivírus humanos

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

iCC/RT-PCR – reação em cadeia de polimerase pós-transcrição reversa integrada ao cultivo celular

ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)

IF – Imunofluorescência

IFI – Imunofluorescência indireta

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IME – Imunomicroscopia eletrônica

IPTSP – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

ITRs – *Inverted terminal repeat sequences* (Sequência terminal repetida invertida)

KB – Células de carcinoma bucal

KCl – Cloreto de potássio

kDa – KiloDalton

LLC-MK2 – Célula de rim de macaco *Rhesus*

LLR – Vacina contra rotavírus de vírus atenuado de origem ovina, sorotipo G10

M – Molar

MA – 104 – Células de rim de macaco *Rhesus*

MAb – *Monoclonal antibody* (Anticorpo monoclonal)

ME – Microscopia eletrônica

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

MRC-5 – Células de fibroblasto de pulmão humano

mRNA – RNA mensageiro

mL – Mililitro

mM – Milimolar

µg – Micrograma

MS – Ministério da saúde

µl – Microlitro

µM – Micromolar

n – frequência absoluta

NaCl - Cloreto de sódio

NASBA - amplificação baseada em seqüência de ácido nucléico

Nested-PCR – Polimerase em cadeia de polimerase de amplificação de produto já amplificado

ng – Nanograma

NLVs - Norwalk-like virus

nm – Nanômetro

NDP – Nucleotídeo difosfato

NSP – *Non-structural protein* (Proteína não estrutural)

NTP – Nucleotídeo trifosfato

NV - Norovirus

pb – Pares de base

PBS – *Phosphato buffer salt* (Tampão fosfato salina)

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

pH – Potencial de hidrogênio

pLC/PRF/5 – Células de hepatoma de fígado humano

q.s.p – Quantidade suficiente para

RE – Retículo endoplasmático

RFLP – *Restriction fragment lenght polymorphism* (Polimorfismo de fragmentos de DNA por clivagem com enzima de restrição)

RLA – Região de leitura aberta

RNA - *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucléico)

RRV-TV - *Rhesus-human reassortant vaccine* (Vacina tetravalente de origem símio-humana para rotavírus)

RT – *Reverse transcription* (Transcrição reversa)

RT-PCR – Reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa

RV – Rotavírus

SDS - duodecil sulfato de sódio

SLVs - Sapporo-like virus

ssRNA – *Single strand ribonucleic acid* (RNA fita simples)

SV - Sapovirus

TP – *Terminal protein* (Proteína terminal)

T84 – Células de carcinoma de cólon humano

UFG – Universidade Federal de Goiás

VP – *Viral protein* (Proteína viral)

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Sequência dos iniciadores utilizados na <i>RT- PCR</i> para a genotipagem de astrovírus humanos. ....	64
<b>Quadro 2</b> - Sequência dos iniciadores utilizados na <i>Nested - PCR</i> para a genotipagem de astrovírus humanos.....	65
<b>Quadro 3</b> - Iniciadores específicos utilizados no ensaio de RT - PCR, para a detecção de calicivírus e tamanho esperado do produto amplificado .....	67
<b>Quadro 4</b> - Iniciadores específicos utilizados no ensaio de RT -PCR, para a detecção de calicivírus e tamanho esperado do produto amplificado .....	
<b>Quadro 5</b> - Distribuição das mulheres positivas para os vírus gastroentéricos segundo a presença de diarreia, carga viral e dosagem de TCD4 .....	85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Distribuição das mulheres examinadas segundo os grupos amostrais .....	69
<b>Tabela 2</b> - Distribuição dos vírus gastroentéricos encontrados e proporção de amostras fecais positivas .....	71
<b>Tabela 3</b> – Distribuição das mulheres positivas para os vírus gastroentéricos segundo a presença ou não do HIV .....	72
<b>Tabela 4</b> - Distribuição das mulheres portadoras de vírus gastroentéricos segundo o estado gestacional e a infecção pelo HIV .....	72
<b>Tabela 5</b> - Distribuição das mulheres portadoras de vírus gastroentéricos segundo sua condição imunológica (gestação e/ou infecção pelo HIV) .....	73
<b>Tabela 6</b> – Distribuição das mulheres portadoras de calicivírus segundo sua condição imunológica (gestação e a infecção pelo HIV) .....	73
<b>Tabela 7</b> – Distribuição das mulheres portadoras de astrovírus segundo sua condição imunológica (gestação e a infecção pelo HIV).....	74
<b>Tabela 8</b> – Distribuição da presença de vírus gastroentéricos nas diferentes amostras de fezes colhidas em cada mulher.....	75

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição das mulheres quanto à faixa etária .....	70
<b>Figura 2</b> - Distribuição das mulheres portadoras de vírus gastroentéricos segundo a faixa etária .....	74
<b>Figura 3</b> - Distribuição de freqüência dos gastroenterovírus .....	76

## **RESUMO**

Os vírus gastroentéricos são importantes agentes etiológicos das gastroenterites afetando indivíduos de todas as idades. Acredita-se que os indivíduos com deficiência do sistema imunitário (humoral e/ou celular) encontram-se mais susceptíveis ao desenvolvimento destas viroses, dentre elas as mulheres grávidas e as portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os rotavírus, adenovírus, astrovírus e calicivírus constituem uma das principais causas de gastroenterite aguda em todo o mundo, sendo responsáveis por elevada morbi-mortalidade principalmente entre crianças com até cinco anos de idade. Acredita-se que aos três anos de idade, cerca de 90% das crianças dos países em desenvolvimento apresentam anticorpos contra um ou mais tipos destes vírus. A infecção neonatal não impede a ocorrência de reinfecção com diferentes sorotipos, porém protege o indivíduo contra o desenvolvimento das formas severas da doença. Este trabalho teve com objetivo identificar rotavírus, adenovírus, astrovírus e calicivírus em mulheres atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG) e buscar a associação entre a presença destes vírus e a baixa imunidade característica em gestantes e/ou portadoras do vírus HIV. O estudo foi um seguimento prospectivo de mulheres atendidas no setor de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG visando detecção de vírus gastroentéricos (rotavírus, adenovirus, astrovírus e calicivirus). Os espécimes clínicos utilizados foram fezes, colhidas no período de 01 de julho de 2006 a 30 de junho de 2007. Para detecção de rotavírus foi utilizado a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e o ensaio imunoenzimático (EIE). Para detecção de calicivirus e astrovirus foi utilizada a reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR) e o EIE para adenovírus. A genotipagem de astrovirus foi feita por Nested-PCR. Foram estudadas 84 mulheres das quais foram analisadas 314 amostras fecais. Do total de mulheres, 29 eram pacientes soropositivas para HIV, 55 soronegativas, 45 e 39 eram gestantes e não gestantes, respectivamente. As pacientes tinham idade variando de 16 a 67

anos, sendo que 47% delas tinham até 30 anos. Das 84 pacientes, 19 (22,6%) foram positivas para algum dos vírus gastroentéricos pesquisados - calicivírus (14/19) e astrovírus (6/19), com predominância de positividade nas amostras fecais colhidas nos meses julho e agosto (astrovírus) e setembro e outubro (calicivírus). Não foram identificadas amostras fecais positivas para rotavírus ou adenovírus. A associação da presença dos vírus gastroentéricos com a gestação, acrescida ou não do vírus HIV, foi de 68,4% (13/19), no entanto não houve diferença estatística significativa com o grupo de mulheres que não se encontrava grávida e nem eram portadoras do vírus HIV. Os vírus gastroentéricos estiveram presentes numa parcela relevante (22,6%) desta população de mulheres adultas estudadas, representados pelos calicivírus (16,7%) e astrovírus (7,1%). Não foram encontrados rotavírus e adenovírus. Nas condições do presente estudo, não houve associação entre a gestação acrescida ou não da presença do HIV como fator redutor da capacidade imunológica e a presença dos vírus gastroentéricos; ou seja, o estado gravídico e/ou ser portadora do HIV não aumentou a chance destas mulheres serem portadoras destes vírus gastroentéricos.

## **ABSTRACT**

The gastroenteric viruses are important etiological agents of gastroenteritis in individuals of all ages. It is believed that individuals with deficits in the immune system (humoral and/or cellular), among them pregnant women and human immune deficiency virus (HIV)-seropositive women, are more susceptible to these viral infections. The rotaviruses, adenoviruses, astroviruses, and caliciviruses constitute are among the main causes of acute gastroenteritis in the world, and are accounted for high morbi-mortality rates, especially among children under five years of age. It is believed that, by the age of three, approximately 90% of all children in developing countries have antibodies to one or more of these agents. Neonatal infection does not exclude the possibility of re-infection, with different viral serotypes, however it protects the individual against severe disease. This study aimed at the detection of

rotavirus, adenovirus, astrovirus e calicivirus in women seeing at the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG) and at the investigation of as association between the positivity to this viruses and the low immune status, characteristic in pregnant women and/or HIV-seropositive women. This was a prospective follow-up study of women seeing at the Gynecology and obstetrics (OB-GYN) sector of the HC-UFG aiming at the detection of gastroenteric viruses (rotavirus, adenovirus, astrovirus e calicivirus). For this, fecal samples were collected from 84 women, in the period from July-2006 to June-2007. For rotavirus detection, fecal samples were screened by polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) and by an immunoenzimatic assay (IEA). The calicivirus and astrovirus were detected by polymerase chain reaction post-reverse transcription (RT-PCR), and adenovirus detection was performed by an EIE. The astrovirus genotyping was conducted by Nested-PCR. Three-hundred and fourteen fecal samples were collected from a total of 84 women. From those 84 women, 29 were HIV-seropositive, 55 HIV-seronegative, 45 were pregnant at the time, and 39 were not pregnant. The patients were aged between 16 and 67 years-old, and 47% of them had up to 30 years of age. From the total 84 patients, 19 (22.6%) were positive for calicivirus and/or astrovirus in at least one of the collected samples, as follows: calicivirus (14/19) and astrovirus (6/19), with the highest positivity rates being detected in the months of July and August (astrovirus) and September and October (calicivirus). None of the collected samples were positive for rotavirus or adenovirus. The association index between gastroenteric virus positivity and pregnancy, in the presence or not of HIV-seropositivity, was of 68.4% (13/19); however, there was no significant difference between the group of women that were not pregnant and the ones that were HIV-seronegative. The gastroenteric viruses were detected in a significant parcel (22.6%) of this population of adult women, and were represented by the caliciviruses (16.7%) and astroviruses (7.1%). Under the conditions of the present study, no association was found between pregnancy and/or positivity for HIV, as reducing factors for the immunological capacity of the women, and the detection of gastroenteric viruses; in conclusion, the pregnancy and/or HIV-seropositivity did not increase the chances of these women to be infected by these gastroenteric viruses.

# **1. INTRODUÇÃO**

A gastroenterite é um importante problema de saúde pública em todo o mundo, acometendo principalmente a população infantil, com elevados índices de morbimortalidade. Estima-se que a mortalidade associada a doenças diarréicas seja de três e cinco milhões de pessoas ao ano, afetando, principalmente, crianças jovens de países em desenvolvimento (Wilhelmi et al., 2003; Okitsu-Negishi et al., 2004).

Os pacientes idosos e os imunodeprimidos (incluindo os transplantados e os portadores do vírus HIV) constituem um grupo susceptível a re-infecções sintomáticas causadas pelos vírus gastroentéricos (Treviio et al., 2001; Sebire et al., 2004).

Dentre os mais de vinte vírus gastroentéricos conhecidos, os mais importantes agentes etiológicos das gastroenterites agudas, são os rotavírus, adenovírus entéricos, astrovírus e calicivírus humanos (Hutson et al., 2003; Wilhemi et al., 2003). Estes vírus possuem distribuição universal e ubíqua, com elevada prevalência, principalmente entre crianças de seis meses a dois anos de idade. Considera-se que os rotavírus sejam mais prevalentes durante os meses frios e secos, os calicivírus ocorram durante todo o ano, com aumento da prevalência no verão e que os astrovírus e adenovírus apresentam sazonalidade variada (Wilhemi et al., 2003).

Estes vírus são transmitidos pela via orofecal, através de contatos íntimos com pessoas infectadas, pela água, alimentos contaminados e por fômites. Infectam as microvilosidades do intestino delgado e multiplicam-se no citoplasma dos enterócitos. Após o rompimento das células epiteliais intestinais infectadas pelos vírus, as mesmas são substituídas por células imaturas da cripta, sem capacidade absorptiva, levando ao processo diarréico e ao desequilíbrio hidroeletrólítico (Kapikian et al., 2001) .

A infecção neonatal por estes agentes é frequente. Aos três anos de idade mais de 90% das crianças apresentam anticorpos contra um ou mais vírus gastroentéricos, entretanto, embora se admita que a infecção prévia não impeça a re-infecção, ela protege contra o desenvolvimento de doença grave (Matsui & Greenberg, 2001).

Durante a gestação, o feto se comporta como um aloenxerto, com cerca de 50% de antígenos não próprios. O período de gravidez se caracteriza, portanto, como um estado peculiar de diminuição da resposta imune na mulher, para permitir o crescimento fetal. Registra-se diminuição de sub-populações e do grau de ativações de linfócitos, comprometendo a produção de auto-anticorpos poli-reativos e a regulação imunológica. Este fenômeno natural de adaptação imunológica que ocorre durante o período gestacional impede a rejeição ao feto, uma vez que o contato com os espermatozoides desenvolve memória linfocitária aos seus antígenos, os quais são novamente apresentados pelo feto (Pereira et al., 2005).

Durante o período de evolução da doença, os portadores do vírus HIV apresentam depleção das células do sistema imune, especialmente linfócitos T CD4, responsáveis, direta ou indiretamente, pela indução de uma ampla variedade de funções celulares linfóides e não-linfóides. Tal depleção compromete a ativação dos macrófagos, a indução das células T citotóxicas, células natural killer, células B e ainda diminui a secreção de fatores solúveis que induzem o crescimento e diferenciação das células linfóides e que afetam as células hematopoiéticas (De Jong et al., 1999).

O primeiro efeito imunossupressivo na mucosa do trato gastrointestinal pelo HIV é a depleção de células T CD4<sup>+</sup> sendo uma das conseqüências, as alterações no desenvolvimento de células B produtoras de IgA. Este fato, associado à hipocloridria estomacal, leva à colonização do intestino delgado por bactérias, contribuindo para inflamação da mucosa, promovendo a atrofia das vilosidades, o que culmina com a má absorção. Com alteração das funções das células T citotóxicas e macrófagos, o trato gastrointestinal, pode então se tornar mais suscetível de infecção por patógenos oportunistas (De Jong et al., 1999; Horwitz et al., 2001).

A importância epidemiológica das manifestações das infecções por este grupo de vírus e as considerações que levam à inclusão de mulheres gestantes (e/ou soropositivas para HIV) em grupo de risco para a infecção viral e desenvolvimento de doenças, levaram à proposta deste estudo, que teve como objetivo identificar rotavírus, adenovírus, astrovírus e calicivírus neste tipo populacional.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

Apesar do aperfeiçoamento na segurança alimentar, no tratamento da água, e nas condições sanitárias as doenças diarréicas representam relevante problema de saúde pública e acometem principalmente crianças com menos de cinco anos de idade, em todo o mundo. Calcula-se que neste grupo de crianças, ocorram mais de 700 milhões de casos de diarréia aguda por ano. Nos países industrializados, indivíduos de todas as faixas etárias apresentam pelo menos um episódio relacionado à gastroenterite aguda a cada ano, sendo elevada a necessidade de hospitalização (Wilhelmi et al., 2003; Costa et al., 2004; Okitsu-Negishi et al., 2004). Estima-se 1,8 milhões de óbitos anuais de crianças menores de cinco anos, causados pela síndrome diarréica em todo o mundo (Patel et al., 2008).

Na década de 40 os vírus foram considerados possíveis agentes etiológicos das gastroenterites (Parashar et al., 1998). Em 1972, utilizando-se a imunomicroscopia eletrônica, confirmou-se a associação do vírus Norwalk em amostras fecais de jovens e adultos com síndromes diarréicas (Kapikian et al., 1972). Em 1973, Bishop et al. observaram por microscopia eletrônica (ME) a presença de partículas, hoje denominadas rotavírus, em cortes histológicos da mucosa duodenal de crianças com gastroenterite. Em 1975 os astrovírus (Madeley & Cosgrove, 1975) e os adenovírus entéricos foram identificados em fezes de crianças com diarréia aguda (Flewett et al., 1975).

Os vírus gastroentéricos são os principais agentes etiológicos de gastroenterite aguda, sendo clinicamente mais relevantes os rotavírus, adenovírus entéricos, astrovírus e calicivírus humanos. Estudos mostram que os torovírus, pestivírus e picobirnavírus que, em geral são responsáveis por quadros diarréicos em animais, também estão associados a casos de diarréia em humanos (Middleton 1996; Desselberger 2000; Wilhelmi et al., 2003). O vírus Aichi, pertencente ao gênero *Kobuvirus*, família *Picornaviridae*, foi isolado em crianças e adultos, em alguns países do Sudeste Asiático (Yamashita et al., 1998; Sasaki et al., 2001; Yamashita et al., 2001); no Brasil e na Alemanha em espécimes de indivíduos portadores de gastroenterites agudas (Oh et al., 2006). O bocavírus, da família *Parvoviridae*, foi identificado como patógeno

humano em setembro de 2005, causando infecções respiratórias em crianças de todo o mundo, bem como sendo isolados de fezes de crianças com gastroenterites agudas. Embora haja evidências de que o bocavírus seja um vírus entérico, há necessidade de mais esclarecimento sobre o seu desempenho como agente etiológico das gastroenterites (Wei-xia et al., 2008; Yu et al., 2008). O bocavírus pode ser transmitido da mãe para o filho pela via transplacentária (Zheng et al., 2007).

## **2.1 ROTAVÍRUS**

Os rotavírus são importantes agentes etiológicos das gastroenterites afetando indivíduos de todas as idades. Embora sejam menos freqüentes em adultos, a infecção pode ocorrer em indivíduos imunocomprometidos, idosos e em adultos que cuidam de crianças infectadas (Anderson & Weber, 2004).

Os rotavírus representam a causa mais comum de diarreia grave na infância em todo o mundo. Nos países em desenvolvimento, estima-se que as gastroenterites associadas a esses agentes virais causem de 20 a 25% do total de óbitos por doença diarreica, bem como 6% da mortalidade global entre crianças com idade inferior a cinco anos (Glass RI, 2005).

A gastroenterite causada por *Rotavirus A* pode ser prevenida pela vacinação, porém, a extensa variabilidade antigênica destes vírus com ocorrência de genótipos particulares em determinadas regiões geográficas, bem como a emergência de genótipos em determinado período de tempo e local (Araujo et al., 2001), torna necessário uma vigilância mundial das amostras circulantes com introdução de vacina específica em diferentes regiões do mundo (Parashar et al., 2003).

### **2.1.1 Classificação taxonômica**

Os rotavírus são agentes etiológicos da gastroenterite, os quais são divididos em sete grupos denominados de A a G. Os Rotavirus do grupo A são

os vírus gastroentéricos mais estudados, portanto os mais bem caracterizados. (Kapikian et al., 2001).

### 2.1.2 Características da partícula viral

Os Rotavirus A pertencem ao gênero *Rotavirus* da família *Reoviridae*. Esses vírus foram primeiramente descritos por Bishop e colaboradores, no início da década de 1970, como agentes etiológicos de gastroenterite em humanos (Bishop et al., 1973). Apresentam morfologia esférica, medem 75-100 nm de diâmetro e possuem simetria icosaédrica. São vírus sem envelope lipídico, no entanto o capsídeo viral é constituído de três camadas concêntricas de proteínas, o capsídeo externo, o capsídeo interno e o *core* que envolve o genoma viral, composto de 11 segmentos de RNA de dupla fita (*dsRNA*) (Pereira et al., 1983; Kapikian et al., 2001).

Os onze segmentos de RNA possuem peso molecular que varia de  $0,2 \times 10^6$  daltons a  $2 \times 10^6$  daltons. Esses segmentos são facilmente visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) pela migração de acordo com o peso molecular. Para os Rotavirus do grupo A, os onze segmentos genômicos têm um padrão de bandejamento característico de 4, 2, 3, 2 segmentos. Dentro desses padrões de migração ocorrem variações que resultam em diferentes padrões eletroferotípicos. A variação mais freqüente ocorre entre os segmentos 10 e 11, os quais definem os denominados padrões de migração longo, curto e super curto (Lourenço et al., 1981).

Seis dos onze segmentos genômicos dos Rotavirus A codificam as seis proteínas estruturais do vírus. Essas são denominadas pela sigla VP seguida de um número arábico que corresponde ao segmento genômico codificante (VP1, VP2, VP3, VP4, VP5\*, VP6, VP7 e VP8\*) que lhe deu origem. As proteínas VP5\* e VP8\* são originadas por clivagem da proteína precursora VP4 e são indicadas por um asterisco (\*) (Estes & Cohen, 1989).

A proteína VP4 é codificada pelo segmento 4, possui aproximadamente 88 kDa, sendo constituída por 776 aminoácidos (aa) e situa-se na camada externa do vírus, na forma de espícula. Ela tem função na adsorção e penetração viral o que ocorre pela ligação de VP8\* a receptor contendo ácido

sialico e pela VP5\* que media a entrada do vírus na célula (Kirkwood et al., 1996). Ela também está associada à restrição do crescimento viral em cultura celular (Greenberg et al., 1983b). É imunogênica com reflexo importante para imunidade ao vírus, sendo responsável pelos genótipos P (Estes, 2001).

A proteína VP6 é a proteína que forma a camada intermediária do vírus. Possui 41 kDa, sendo constituída de 397 aa e é codificada pelo segmento 6 do genoma viral. É o maior constituinte protéico estrutural das partículas virais completas, representando 50 a 60% da massa viral (Prasad & Chui, 1994). Interage com as proteínas da camada externa (VP4 e VP7) e com a proteína do core (VP2). É proteína estável, hidrofóbica e bastante imunogênica (Estes et al., 1987). Na VP6 os antígenos de grupo (espécie) são representados pelos epítomos e a presença ou ausência de outros determinantes antigênicos nessa proteína determina a especificidade para o subgrupo (Greenberg et al., 1983c).

A proteína VP7 possui 326 aa e 37 kDa e pode ser codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 do genoma, dependendo da amostra viral (Estes & Cohen, 1989). Ela é uma glicoproteína e forma a camada externa do vírus. É a segunda proteína mais abundante do vírus e o antígeno indutor da formação de anticorpos de neutralização e responsável pela determinação de sorotipos G (Hoshino & Kapikian, 1996). A sua interação com a VP4 influencia na especificidade de ligação da VP4 ao receptor celular da célula alvo (Ludert et al., 1996).

Os outros cinco segmentos genômicos dão origem a seis proteínas não estruturais, sendo que o segmento onze é responsável pela codificação de duas dessas proteínas (Estes & Cohen, 1989).

As proteínas não estruturais são detectadas nas células infectadas, mas não nas partículas virais maduras. São denominadas pela sigla NSP seguidas de números de um a seis (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6) (Estes, 2001).

NSP4 – O gene NSP4, segmento 10 de RNA de *Rotavirus A*, pode ser geneticamente classificado dentro de pelo menos cinco genogrupos: A, B, C, D e E (Mori et al., 2002). A proteína é glicosilada e ligada ao retículo endoplasmático (RE). Possui 28 kDa e 175 aa (Tian et al., 1996). A NSP4 é uma proteína que não se liga ao RNA, possui função na morfogênese viral e na virulência por funcionar como uma enterotoxina. Na morfogênese celular ela

funciona como um receptor intracelular por mediar a conversão de partículas de dupla camada de citoplasma para partículas de tripla camada no RE. A proteína NSP4 interage com um receptor celular do epitélio intestinal e estimula um sinal de tradução cálcio-dependente que aumenta a permeabilidade da membrana plasmática a íons cálcio e potencializa a secreção clorídrica o que culmina na indução de diarreia (Morris et al., 1999).

### **2.1.3 Patogenia**

Os Rotavirus A são vírus estáveis nas condições ambientais e mantêm a sua viabilidade com a umidade relativa do ar atmosférico em torno de 50%. São normalmente mais resistentes do que a maioria dos vírus à temperatura de 56°C, pH ácido, aos solventes de lipídeos e aos detergentes não iônicos. Mantém a sua infecciosidade após repetidos congelamentos e descongelamentos (Parashar et al., 2003).

Esses vírus são excretados em grande número nas fezes dos indivíduos infectados. Estima-se que sejam encontrados cerca de um trilhão de partículas virais por mililitro de espécime fecal e considera-se que apenas 10 partículas sejam suficientes para iniciar um processo infeccioso (Kapikian et al., 2001). Esses parâmetros, associados à sua notória estabilidade físico-química, são os principais determinantes da alta transmissibilidade dos rotavírus, sobretudo em locais de freqüentes contatos inter-humanos como creches e enfermarias pediátricas (WHO, 2000).

Os Rotavirus do grupo A infectam principalmente os enterócitos maduros da extremidade das vilosidades presentes na mucosa do intestino delgado, sendo que o processo replicativo ocorre no citoplasma (Kapikian et al., 2001).

A transcrição é caracterizada pela síntese de RNA mensageiro, a partir do ácido nucleico viral, e representa o evento chave no processo de infecção. Na transcrição do genoma, cada um dos segmentos distintos é transcrito em um

RNA mensageiro que codifica uma proteína viral, com exceção do segmento 11, que codifica duas proteínas. A tradução destes RNAs mensageiros ocorre nos ribossomos livres, à exceção dos codificantes para as proteínas VP7 e NSP4, as quais são sintetizadas nos ribossomos aderidas ao retículo endoplasmático (Estes, 2001).

É admitida a liberação desses vírus por lise celular, com alterações na permeabilidade da membrana da célula infectada, o que resulta no extravasamento de proteínas celular e viral (Estes, 2001).

Os Rotavirus A são transmitidos primariamente, pela via oral-fecal, e se considera que produzam infecção localizada, não obstante alguns estudos tenham mostrado casos de encefalopatias e viremias associadas a sua presença (Costa et al., 2004).

A infecção viral acomete as células absortivas da mucosa dos segmentos proximais do jejuno e propaga-se alcançando as porções mais distais do íleo. As lesões limitam-se às células que se localizam na parede lateral e no topo das vilosidades, não atingindo as células das criptas de Liberkuhn. Após 8 horas de adsorção do vírus, já se observa a presença de inclusões citoplasmáticas, que contêm proteínas e RNA viral recém-sintetizados, na célula infectada. O processo infeccioso, que pode culminar com manifestações clínicas, instala-se em aproximadamente 48 horas. Os indivíduos infectados excretam elevadas concentrações de vírus logo após o início da infecção, sendo que a excreção de partículas virais atinge um pico máximo no terceiro dia e se mantém até o décimo dia ou mais (Anderson & Weber, 2004).

Os mecanismos pelos quais a diarreia é induzida pelos Rotavirus do grupo A são ainda pouco compreendidos e se admite que múltiplos fatores colaborem simultaneamente para a indução da diarreia por estes vírus. Considera-se que os rotavírus desorganizam a arquitetura normal das vilosidades e microvilosidades da mucosa intestinal, o que resulta em alterações histológicas: atrofia das vilosidades intestinais em graus variados, encurtamento com diminuição da atividade das microvilosidades, mudanças morfológicas das células epiteliais, hiperplasia das criptas de Liberkuhn, redução da relação vilosidade cripta, aumento do infiltrado inflamatório na lâmina própria e descamação epitelial das células necrosadas com exposição da lâmina própria (Estes, 2001).

Nas células absortivas sucedem ainda: dilatação do retículo endoplasmático, tumefação das mitocôndrias, vacuolização citoplasmática e picnose nuclear. Os enterócitos localizados no terço superior das vilosidades, e que contêm as partículas virais, são eliminados no lúmen intestinal e são substituídos por células absortivas imaturas. Essas células apresentam uma menor quantidade de microvilosidades e uma menor capacidade de absorção, resultando em diarreia (Parashar et. al., 2003).

#### **2.1.4 Manifestações clínicas**

A gastroenterite por rotavírus não se constitui por manifestações clínicas típicas que as diferem daquelas associadas a outras etiologias virais. A diarreia acontece após um curto período de incubação e evolui com a instalação abrupta de vômito em mais de 50% dos casos. É seguida de febre de moderada a alta e diarreia aquosa de caráter explosivo que dura de 3 a 8 dias, não se observando nas fezes a presença de leucócitos ou sangue. O quadro clínico pode ainda envolver outros sintomas como náuseas, inapetência e, com menor frequência, dor abdominal de pequena intensidade. O processo infeccioso entra em regressão a partir do terceiro dia, apesar da ocorrência de excreção viral por um período maior (Wilhelmi et al., 2003).

A infecção é auto limitada, com a completa recuperação da morfologia e da função intestinal e secreção de anticorpos circulantes, entretanto pode ser fatal em lactentes, desnutridos, desidratados, crianças de baixo peso e idosos (Estes et al., 2001).

#### **2.1.5 Epidemiologia**

Os Rotavirus do grupo A são os principais agentes causadores de gastroenterite aguda em todo o mundo, em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Kapikian et al., 2001).

Esses vírus possuem incidência universal e são ubíquos na natureza e infectam crianças de todas as condições sócio-econômicas, que vivem em áreas tropicais ou temperadas (Costa et al., 2004).

Assim, esses vírus são responsáveis pela ocorrência de maior número de casos de gastroenterites em lactentes e crianças e, muito embora incomum em adultos, a infecção pode ocorrer em indivíduos imunocomprometidos, em adultos que cuidam de crianças infectadas, em viajantes e indivíduos de terceira idade (Anderson & Weber, 2004).

A maioria das infecções por Rotavirus A ocorre na faixa etária de seis a vinte e quatro meses, e se considera que no primeiro semestre de vida, os anticorpos maternos transferidos passivamente, bem como o aleitamento natural, exerçam função protetora contra o agente (Glass et al., 2004).

Considera-se que até os quatro anos de vida quase todas as crianças já tenham sofrido pelo menos uma infecção por rotavírus, que pode ser sintomática ou assintomática, o que lhes confere proteção contra síndromes diarreicas graves (Linhares, 2000).

No Brasil, a ocorrência desses agentes varia de 12 a 42% em crianças com gastroenterite aguda, atendidas em ambulatórios ou hospitais (Linhares, 2000). Em Goiânia o rotavírus do grupo A foi isolado em 14,4% de 2605 espécimes fecais de crianças de até 10 anos de idade, com ou sem diarreia atendidas em hospitais, serviços de urgências e clínicas, no período de 1986 a 2000 (Cardoso et al., 2003). Em 207 crianças hospitalizadas com diarreia aguda em Goiânia, entre julho de 2000 e outubro de 2002, 37,2% dos primeiras espécimes fecais analisadas, eram positivas para o rotavírus do grupo A (Costa et al., 2004). Andreasi et. al em 2007, encontraram 23,2% de amostras fecais positivas para rotavírus em crianças de até 3 anos, hospitalizadas com diarreia aguda em Campo Grande. Em São Paulo, 20% das crianças e adultos, atendidas em um hospital, com gastroenterite aguda eram positivas para o rotavirus do grupo A (Carraro et al., 2008). Domingues et al., 2008, encontrou 15% de rotavírus do grupo A em crianças com diarreia na cidade de Uberaba-MG e no Estado do Paraná, 21,8% das crianças e adultos com gastroenterite (Santos et al., 2008).

### 2.1.6 Diagnóstico laboratorial

Na síndrome diarréica é importante a confirmação do diagnóstico laboratorial porque, além de diferentes tipos de vírus, outros agentes podem estar envolvidos na etiologia da doença. O diagnóstico laboratorial da infecção aguda baseia-se principalmente na pesquisa do vírus e dos antígenos presentes nas fezes de pacientes infectados. Para o exame direto do material fecal é possível recorrer-se a várias diferentes técnicas imunológicas e não imunológicas. As técnicas imunológicas rotineiramente utilizadas são: o ensaio imunoenzimático (EIE), a aglutinação de partículas de látex e a imunomicroscopia eletrônica (IME). As técnicas não imunológicas mais utilizadas são: a microscopia eletrônica direta (ME) e a EGPA (Pereira et al., 1983; Kapikian et al., 2001).

A EGPA é um método sensível e específico que, além de permitir o diagnóstico das infecções por Rotavírus do grupo A e não A, possibilita a classificação da amostra viral com base no padrão eletroferotípico. Esse método possui grande valor diagnóstico, com particular relevância nas situações epidêmicas (Pereira et al., 1983)

O EIE para rotavírus consiste na utilização de anticorpos contra a proteína VP6 em microplacas para detecção do antígeno viral (Pereira et al., 1985).

A caracterização de amostras de Rotavirus A em subgrupos e genótipos G e P são necessárias para o monitoramento desses vírus. Essa caracterização tem sido feita tanto por métodos imunológicos, que utilizam anticorpos monoclonais específicos, quanto por métodos moleculares a partir de procedimentos que utilizam iniciadores específicos, seja com a finalidade de amplificação genômica, NESTED-PCR ou como detectores em ensaio de hibridização (Parashar et al., 1998).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação usada para sintetizar, *in vitro*, seqüências específicas de DNA. Inicialmente, um ácido nucleico alvo (DNA ou RNA) é isolado. Se o ácido nucléico alvo é RNA, este deve ser convertido em cDNA através de transcrição reversa (RT) antes de começar o processo de amplificação. A partir daí, o DNA é amplificado enzimaticamente (Parashar et al., 1998).

A nested-PCR é a amplificação de um produto já amplificado utilizando iniciadores específicos. Nesta técnica, realizam-se dois ensaios consecutivos de PCR. No primeiro, um segmento de DNA é amplificado com um par de iniciadores, empregando-se de 15 a 30 ciclos de amplificação. Uma alíquota do material amplificado é então submetida a nova amplificação usando-se novo par de iniciadores, localizados internamente em relação à posição do par inicial. Essa técnica apresenta sensibilidade superior à do PCR e é recomendada quando a concentração de adido nucleico é reduzida ou também para a genotipagem de amostras (Lovmar et al., 2003).

### **2.1.7 Imunidade**

Considera-se que tanto a infecção pelo vírus selvagem quanto pelo vírus vacinal induza uma resposta imune que protege contra as formas graves da doença em infecções sucessivas (Velásquez et al., 1996; Estes et al., 2001).

Admite-se que durante a infecção primária são produzidos anticorpos da classe IgM, caracterizando a fase aguda da doença. De duas a quatro semanas após o início do processo infeccioso, a IgA e a IgG atingem o pico máximo, mantendo-se em níveis detectáveis no soro por período prolongado (Kapikian et al., 2001).

A imunidade local, produzida por IgA secretória na luz intestinal, parece conferir maior proteção contra diarreia por rotavírus. Esse fato tem estimulado pesquisas para produção de uma vacina de administração oral (Glass et. al., 2005)

### **2.1.7 Tratamento e prevenção**

Práticas de higiene como lavagem das mãos, cuidados com a água e os alimentos, bem como destinação adequada dos dejetos humanos e animais não parecem determinar impacto suficiente para o controle e a profilaxia das infecções por Rotavírus do grupo A, uma vez que nos países desenvolvidos,

onde os padrões de higiene são satisfatórios, repetem-se anualmente extensas epidemias (Kapikian et al, 2001).

Admitem-se também certas dificuldades para impedir a transmissão do vírus entre pacientes hospitalizados. O procedimento utilizado para isso tem sido o isolamento dos pacientes internados para limitar a disseminação da infecção. Medidas universais de precaução como a lavagem rigorosa das mãos e o uso de equipamentos de proteção individual como luvas, gorros e máscaras são recomendadas durante os cuidados com o paciente infectado por esses agentes (Anderson & Weber, 2004).

O tratamento dos dejetos e a melhoria das condições sanitárias constituem ainda medidas de controle, prevalecendo, no entanto, o conceito de que o recurso mais efetivo de profilaxia das diarreias por rotavírus reside na obtenção de um imunizante eficaz (Estes et al, 2001).

A vacina tetravalente designada RRV-TV (*rhesus-human reassortant tetravalent vaccine*) alcançou níveis protetores que fundamentaram o seu licenciamento nos EUA em agosto de 1998. Após um ano, uma vez administrada a 900.000 crianças, emergiram 15 casos de intussuscepção (ou invaginação intestinal) como possível evento adverso associado à vacina, sobrevivendo a suspensão do seu uso (Glass et al., 2005; Clark et al., 2004).

As vacinas para rotavírus licenciadas disponíveis atualmente no mercado são:

*LLR* – preparada com rotavírus atenuado de origem bovina, sorotipo G10, apesar do licenciamento para uso em larga escala, ainda persistem restrições sobre a metodologia empregada nos testes. Foi licenciada na China em 2000 (Linhares et al., 2000; Glass et al., 2005).

*RotaTeq* - preparação pentavalente, derivada da amostra bovina WC3, reunindo amostras geneticamente reestruturadas com especificidades antigênicas para os tipos G1, G2, G3, G4 e P1A[8]. A vacina foi licenciada no início de 2006 pelo “Food and Drug Administration” (FDA) nos EUA. Esta revelou-se 94,5% eficaz frente às hospitalizações e consultas nas emergências relacionadas aos tipos virais G1 a G4, reduziu em 74% as gastroenterites associadas a esses sorotipos e exibiu níveis protetores de 98% referentes aos episódios graves causados por rotavírus (Glass et al., 2005; Vesikari et al., 2006).

*RotaRix (amostra RIX4414)* – preparado de rotavírus, G1P(8), atenuados de origem humana. Essa preparação monovalente foi testada em 11 países da América Latina e na Finlândia, nos quais foram recrutadas 63.225 crianças que determinou a segurança da vacina em relação ao risco da intussuscepção e uma eficácia para episódios graves de gastroenterite para rotavírus, de até 85%. Ela já foi licenciada em vários países da América do Sul e no Kuwait (Perez-Schael et al., 1997; Linhares et al., 2000; Simonsen et al., 2005).

Nos ministérios da saúde dos países em desenvolvimento, os custos e a sustentabilidade de um proposto programa universal para imunização contra rotavírus prevalecem como temas centrais. Aliás, ressalte-se o papel de vanguarda assumido pelo Ministério da Saúde no Brasil, assegurando o acesso amplo da vacina contra rotavírus, G1P(8), no setor público já em 2006 (Vesikari et al., 2006).

O tratamento da gastroenterite causada pelo rotavírus é sintomático. A redução na mortalidade infantil nos países desenvolvidos, nos últimos anos, deve-se ao diagnóstico precoce, ao acesso rápido aos sistemas de saúde e administração da terapia de reposição hidroeletrólítica, oral ou venosa, principalmente nos casos que envolvem vômitos constantes (Estes et al., 2001).

É recomendado manutenção da dieta, principalmente se o aleitamento for natural, uma vez que leite materno contém anticorpos específicos e fatores inespecíficos protetores (Kapikian et al., 2001).

## **2.2 ADENOVÍRUS**

Os adenovírus humanos (HAdVs) podem causar várias síndromes clínicas incluindo gastroenterite, doença respiratória, conjuntivite, cistite hemorrágica e exantema (Horwitz, 2001).

Embora os adenovírus humanos sejam mais associados a infecções respiratórias, alguns sorotipos causam gastroenterites e são considerados relevantes em surtos esporádicos de gastroenterites agudas no mundo (Van et al., 1992).

Foram inicialmente detectados em 1953. O termo adenovírus surgiu do isolamento dos primeiros vírus em adenóides humanas extirpadas (Rowe et al., 1953, Flewett et al., 1975).

Os adenovírus são responsáveis por 2,3 a 38 % das gastroenterites agudas nas crianças e imunodeprimidos (McIver, 2001; Marie-Cardine, 2002). No Brasil tem sido encontrado índices que variam de 4,9 a 10% (Harsi, 1995; Soares, 2002).

### **2.2.1 Classificação taxonômica**

Os adenovírus (AdV) constituem a família *Adenoviridae*, que é subdividida em quatro gêneros, *Mastadenovirus*, que infectam humanos e outros mamíferos; *Aviadenovirus* que infectam aves; *Atadenovirus* que infectam mamíferos (marsupiais e cervos) répteis (cobras) e aves (patos); e *Siadenovirus* que infectam anfíbios (rãs) e aves (perus) (Benko et al, 2002). O gênero *Mastadenovirus*

é formado por mais de 90 sorotipos, dos quais 52 infectam humanos e subdividem em sete subgêneros ou espécies (A-G) com base nas suas propriedades físicas, químicas e biológicas (De Jong, 1999; Horwitz, 2001; Jones, 2007).

Cada sorotipo do gênero *Mastadenovirus* é determinado por neutralização utilizando anticorpos dirigidos contra as duas maiores proteínas do capsídeo, o hexon e a fibra. Para a classificação das espécies são considerados o percentual de bases nitrogenadas da espécie (guanina e citosina), o potencial oncogênico em roedores, o grau de homologia do DNA viral, o tamanho da fibra, o peso molecular de alguns polipeptídeos e o padrão de fragmentação do genoma por enzimas de restrição (Albert et al., 1986; Reddy et. al., 2005).

### **2.2.2 Características da partícula viral**

Os adenovírus são partículas icosaédricas, não envelopadas, com capsídeo formado por 252 capsômeros, sendo 240 hexon e 12 penton (Stewart

et al., 1993). Da base de cada *penton* projeta-se uma estrutura protéica denominada fibra, a qual possui comprimento variável conforme o sorotipo. Na extremidade de cada fibra existe uma protuberância que possui propriedade imunogênica, tendo ainda como função a adsorção do vírus à célula hospedeira (Norrby, 1969).

O genoma do adenovírus consiste de uma molécula linear de fita dupla de DNA de 80 a 110 nm de diâmetro, massa molecular de 20-24 x 10<sup>6</sup> Da, com aproximadamente 36000 pares de bases (pb) e composição de 47-60% de bases guanina mais citosina (Hierholzer, 1992). Nas extremidades do DNA há sequências nos terminais (3'e 5') repetidas e invertidas (ITRs) que variam de tamanho (103-165 nucleotídeos) de acordo com o sorotipo de adenovírus (Shinagawa, 1987).

O genoma viral possui de um a dois genes (dependendo do sorotipo) denominados VA (vírus associado) transcritos pel RNA-polimerase III. Os VA RNAs estimulam a síntese protéica viral e ainda antagonizam a ação antiviral de interferon induzido pelo sistema imune (Ma & Mathews, 1996).

O genoma possui diferentes regiões de transcrição, as quais são transcritas temporalmente. São denominada regiões iniciais (E1, E2, E3 e E4), regiões iniciais tardias (IX e IVa2) e região tardia (MLP-promotor maior tardio). As regiões E1 e E2 são subdivididas em E1A, E1B, E2A e E2B e a região tardia é processada pra gerar cinco famílias de mRNAs tardios (L1 a L5) (Shenk, 2001).

A transcrição dos genes dos adenovírus é um evento de duas fases, ocorrendo antes e depois da replicação do DNA viral (Shenk, 2001).

O gene E1A codifica duas proteínas (253R e 191R) que ativam a transcrição de outros genes; E1B codifica duas proteínas que bloqueiam a apoptose. E2 codifica proteínas que sinalizam para a replicação do DNA, dessa forma na região E2A é codificada uma proteína, DBP, que se liga a fita simples do DNA e na E2B uma DNA polimerase, além de uma proteína precursora terminal. Os produtos de E3 modulam a resposta do hospedeiro para a infecção viral. E4 possui cinco RLAs, podendo variar com a espécie, cujos produtos possuem funções de regulação transcricional, transporte de mRNA, modulação da replicação do DNA e apoptose celular (Shenk, 2001; Reddy et al., 2005).

As regiões iniciais tardias estabilizam as interações *hexon-hexon* e ainda tem função na encapsidação do DNA e os mRNAs tardios (L1 a L5) são responsáveis pela produção e montagem dos componentes do capsídeo (Shenk, 2001; Reddy et al., 2005).

O virion possui onze proteínas, as quais são convencionalmente numeradas iniciando pelo polipeptídeo II, a IX, IIIa,  $\mu$ , TP (proteína terminal) e mais a p53 (protease viral) (Maizel et al, 1968). O capsídeo viral é composto de sete polipeptídeos (II, III, IIIa, IV, VI, VIII e IX) (Horwitz et al., 1970).

O *core* do virion que circunda o genoma viral é formado por cinco proteínas básicas, ricas em arginina (V, VII,  $\mu$ , TP e p53). A proteína VII envolve e empacota o DNA viral, a proteína V faz a ponte entre o *core* e o capsídeo e a proteína terminal (TP) serve com iniciador para a replicação do DNA e auxilia a ligação do genoma viral à matriz nuclear (Chatterjee et al., 1986; Everitt et al., 1975).

### 2.2.3 Patogenia e manifestações clínicas

Os adenovírus infectam e podem se replicar em células epiteliais das vias respiratórias, olho, trato gastrointestinal, bexiga e fígado.

Os vírus da espécie C persistem durante anos como infecções latentes nas adenóides e amígdalas e são eliminados nas fezes durante muitos meses após a infecção inicial. A maioria dos adenovírus cresce no epitélio intestinal após ingestão, porém na maioria das vezes produzem infecções subclínicas. Embora os sorotipos de adenovírus mais frequentemente associados à gastroenterite sejam os sorotipos 40 e 41 (espécie F), outros sorotipos como 12,18 e 31 (espécie A) (Brown et al., 1996), e os sorotipos 1, 2 e 5 (espécie C) também têm sido associados à síndrome (Li et al., 2005) e mais recentemente o sorotipo 52 sugerido por Jones et al, 2007.

As infecções causadas pelos adenovírus são comuns na população pediátrica e apresentam uma distribuição universal. Nos imunocompetentes eles se expressam como ligeiras infecções respiratórias, gastrointestinais, oculares e urinárias, geralmente auto-limitadas que melhoram em duas

semanas, deixando imunidade específica contra o sorotipo viral. Nas crianças imunocomprometidas, a incidência de sintomas graves é significativamente mais elevada, e os índices de letalidade podem atingir de 50% a 80%. Os casos mais graves incluem pneumonia, colite, cistite hemorrágica e hepatite (Cichocki et al., 2008; Abarca et al., 2008).

## 2. Epidemiologia

Os adenovírus induzem imunidade eficaz e prolongada contra a reinfecção. A resistência à doença clínica parece estar diretamente relacionada à presença de anticorpos (IgG) neutralizantes circulantes (De Jong et al., 1999).

Os adenovírus são encontrados em todas as partes do mundo, em todas as estações do ano. Propagam-se pela via orofecal, perdigotos ou fômites contaminados (Giordano et al., 2001; Horwitz et al., 2001).

Várias espécies e sorotipos de adenovírus foram encontrados em águas de instituições públicas de diversões, incluindo os sorotipos 40 e 41, na região dos grandes lagos nos EUA (Xagoraki et al., 2007).

A espécie (G) de adenovírus foi isolada em 2007 em amostras fecais de cinco pacientes de Los Angeles nos EUA, com surto de gastroenterite. Trata-se, provavelmente do sorotipo 52, o qual é semelhante ao sorotipo 41 da espécie F (Jones, 2007).

Os adenovírus entéricos sorotipos 40 e 41 da espécie F causam surtos de gastroenterite em crianças em todo o mundo, sendo predominante o sorotipo 41 (Fukuda et al., 2006). Em 892 crianças de Hiroshima, Japão, portadoras de diarreia aguda, o adenovírus foi a causa de 3,4 % da síndrome, das quais 3,3% pertenciam ao sorotipo 40 e 96,7% do sorotipo 41 (Fukuda et al., 2006). Ainda no Japão, foi observado que os adenovírus foram causa de 8% das diarreias agudas de crianças de Maizuru, das quais 85% tinham sorotipo 41 (Shimizu et al., 2007). Andreasi e col em 2008 encontraram 3,6% de adenovírus em crianças com gastroenterite aguda em Campo Grande (MS). Em Rondônia, 6,4 % de crianças com até cinco anos, hospitalizadas com diarreia aguda, eram

postivas para adenovírus (Magalhães et al., 2007). Em Goiânia (GO), Cardoso et al., em 1992 encontraram 2,4% e 1,5% de adenovírus em crianças de até cinco anos de idade com e sem diarreia, respectivamente

## **2.2.5 Diagnóstico laboratorial**

As características clínicas das gastroenterites causadas pelos adenovírus são semelhantes às aquelas causadas por outros patógenos gastroentéricos. A definição do agente etiológico é feita através do diagnóstico laboratorial (Ruuskanen et al., 1997).

### **2.2.5.1 Detecção viral**

Isolamento em culturas celulares: Os adenovírus podem ser isolados de excreção de nasofaringe, conjuntiva, líquido cerebrospinal, sangue, urina, fezes e material de biópsia (Ruuskanen et al., 1997).

Todos os sorotipos de adenovírus, exceto o EAd40 e EAd41, se propagam com facilidade e produzem efeito citopático (ECP) em vários grupos celulares. As células mais permissivas são as células de rim de embrião humano (HEK) (Krisher et al, 1987), seguindo-se as células de carcinoma de pulmão humano (A-549), células de carcinoma da cérvix uterina (HeLa), células de carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2), células de carcinoma da cavidade bucal (KB) e fibroblastos de pulmão humano (MRC-5). Os EAd 40 e EAd41 se propagam principalmente em células conjuntivais Chang, HEp-2, células terciárias de rim de macaco *Cynomolgus* e células de rim de embrião humano transformadas com DNA de AdVH5 (HEK-293) (Kidd & Madeley, 1981; De Jong et al., 1983).

O efeito citopático produzido pelos adenovírus é característico, geralmente inicia-se na periferia da monocamada celular onde se observam células arredondadas, agregação de células intumescidas (cachos de uva ou rede de pescador) e inclusões intranucleares (Ruuskanen et al., 1997).

O cultivo celular além de promover o isolamento viral apresenta a vantagem de aumentar a quantidade de partículas virais para a sua posterior caracterização.

A identificação dos vírus isolados pode ser feita através de imunofluorescência (IF), fixação de complemento (FC), inibição da hemaglutinação (HI) e soroneutralização (SN) (Hierholzer, 1995).

A ME é usada para detectar adenovírus tanto de material de cultivo quanto espécime clínico, onde se observa a morfologia característica destes agentes, sendo que a descoberta dos adenovírus “não cultiváveis” foi realizada por este método (Flewett et al., 1975). Os adenovírus podem ainda serem detectados diretamente no espécime clínico utilizando a IF, EIE, e a aglutinação em látex (Herrmann et al., 1987).

Caracterização viral: A identificação dos sorotipos de adenovírus pode ser feita utilizando qualquer das metodologias de detecção com IF, EIE, SN ou por IME utilizando anticorpos monoclonais epítomos específicos do *hexon* ou da fibra (Noel et al., 1994).

Os métodos moleculares permitem a definição da espécie e do sorotipo do adenovírus. Destaca-se a reação em cadeia pela polimerase (PCR), para a qual se utiliza iniciadores específicos para a região do *hexon* ou das regiões VAI e VAII (Hierholzer et al., 1993; Pring-Akerblom et al., 1999). Para os EAd40 e EAd41 são utilizados iniciadores específicos para a região E1B (Allard et al., 1992).

A caracterização dos sorotipos de adenovírus também pode ser feita pela análise de polimorfismo dos fragmentos de DNA em gel de agarose (*RFLP – Restriction Fragment length polymorphism*), onde o sítio de clivagem do DNA por enzima de restrição é dependente da sequência do DNA. A presença de mutações em um sítio de clivagem potencial resulta em padrões diferentes de fragmentação do genoma quando esses fragmentos são separados em gel de agarose. A desvantagem deste método é que ele requer uma grande quantidade de DNA no espécime clínico. Portanto necessita da amplificação prévia do DNA viral pela PCR que resulta na chamada PCR-*RFLP* (Li et al., 2005).

Outra metodologia utilizada para a caracterização de adenovírus é a hibridização do DNA viral com sondas específicas tanto para a determinação da espécie quanto para os sorotipos (Suzuki et al., 1981).

## **2.2.6 Tratamento e Controle**

O tratamento da gastroenterite aguda por adenovírus é sintomático. É necessário o diagnóstico precoce, o acesso rápido aos sistemas de saúde e administração da terapia de reposição hidroeletrólítica, oral ou venosa, principalmente nos casos que envolvem vômitos constantes (Horwitz, 2001; Deno et al., 2005).

É recomendado manutenção da dieta, principalmente se o aleitamento for natural, uma vez que o leite materno contém anticorpos específicos e fatores inespecíficos protetores. O tratamento dos dejetos e a melhoria das condições sanitárias constituem ainda medidas essenciais de controle (Horwitz, 2001).

Na infecção grave causada pelos adenovírus em pacientes imunodeprimidos pode ser utilizados antivirais. No Chile, em uma criança de 12 anos submetida a transplante de células do sistema hematopoiético, usuária de corticóide e imunossupressor, com infecção grave por adenovírus foi utilizado o antiviral cidofovir, porém evoluiu para óbito após três dias de tratamento (Abarca et al., 2008).

## **2.3 ASTROVÍRUS**

### **2.3.1 Histórico**

A primeira evidência da associação de astrovírus com casos de gastroenterite aguda foi relatada em 1975, quando ocorreu um surto diarréico numa maternidade localizada no Sul da Inglaterra (Appleton e Higgins, 1975). Neste surto, em oito de 14 amostras fecais das crianças estudadas, foi observada a presença de partículas virais semelhantes a pequenos vírus

arredondados de 29 a 30 nm de diâmetro pelo uso da ME. No mesmo ano foram denominados astrovirus por Madeley e Cosgrove, uma vez que visualizados sob ME apresentavam projeções na superfície semelhante a uma estrela de cinco a seis pontas (Appleton e Higgins, 1975).

O cultivo de astrovirus empregando células de rim de embrião humano para isolamento inicial em espécimes fecais com subsequente adaptação de algumas amostras para propagação em linhagem contínua de rim de macaco Rhesus, na presença de tripsina, foi relatado pela primeira vez por Lee e Kurtz, em 1981 (Kurtz & Lee 1984). Posteriormente, foi determinada a existência de cinco sorotipos virais pelo uso da técnica de imunofluorescência (Kurtz & Lee, 1984). Atualmente, os astrovirus humanos são classificados em oito sorotipos/genotipos (Méndez-Toss et al. 2000; Sakamoto et al., 2000).

No final da década de 1980, foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático que visava detectar antígeno viral, e em 1991, a relevância médica destes vírus, como agente etiológico da gastroenterite foi estabelecida (Hemmann et al., 1988; Herrmann et al., 1991).

A década de 1990 foi marcada pelo advento de técnicas moleculares que permitiram o desenvolvimento de procedimentos com maior sensibilidade e especificidade para a detecção viral, como a RT-PCR, além de metodologias que visavam a clonagem e o seqüenciamento do genoma viral (Matsui & Greenberg, 2001; Mitchell, 2002; Walter & Mitchell, 2003), possibilitando assim, o conhecimento e comparação das seqüências de nucleotídeos dos genomas entre os tipos de astrovirus humanos e animais conhecidos, além de dados sobre as seqüências completas dos genomas dos seguintes tipos humanos: tipo 1 (Lewis et al., 1994), tipo 2 (Jiang et al., 1993), tipo 3 (Oh & Schreier, 2001) e tipo 8 (Méndez-Toss et al., 2000)

### **2.3.2 Classificação taxonômica**

Os astrovirus pertencem à família *Astroviridae*, a qual é dividida em dois gêneros *Mamastrovirus* e *Avastrovirus*. O gênero *Mamastrovirus* inclui os oito tipos de astrovirus humanos e aqueles que acometem suínos, felinos, caninos,

bovinos e ovinos O gênero *Avastrovirus* engloba astrovirus que infectam aves como patos, perus e galinhas (Matsui & Greenberg, 2001; Lukashov & Goudsmit, 2002; Mitchell, 2002).

### 2.3.3 Características da partícula viral

Os Astrovírus são pequenos vírus esféricos com 28 a 40 nm de diâmetros. Não possuem envoltórios lipídicos e são constituídos de capsídeos icosaédricos formados por dois ou três tipos de proteínas (P1, P2 e P3), dependendo do sorotipo (Matsui & Greenberg, 1996; Bass & Qiu, 2000). A morfologia peculiar desses vírus é a de uma estrela de 5 a 6 pontas; a qual é observada somente em dez por cento das partículas virais quando visualizadas através da ME ou quando submetidas a soluções alcalinas concentradas (Matsui & Greenberg, 2001).

Estes vírus possuem um genoma de RNA fita simples (ssRNA) polaridade positiva com aproximadamente 6.800 nucleotídeos sendo poliadenilado na sua extremidade 3' (Greenberg & Matsui, 1992; Matsui & Greenberg, 1996; Matsui & Greenberg, 2001). A organização genômica dos astrovirus inclui três regiões de leitura aberta, RLA1a, RLA1b e RLA2, cada qual codifica para pelo menos uma poliproteína viral (Méndez et al., 2002; Méndez et al., 2003).

As extremidades 5' e 3' do genoma viral possuem duas regiões não codificantes compostas por aproximadamente 80 nucleotídeos cada uma, sendo que a primeira antecede a RLA1a e a outra intercala a RLA2 e a cauda poliadenilada. As regiões RLA1a e RLA1b, localizadas próximas a extremidade 5' do genoma, são responsáveis pela codificação de uma poliproteína não-estrutural, denominada NSP1ab de 160 kDa e a qual é clivada em duas proteínas NSP1a (103 kDa) que exibe uma seqüência codificante para a protease viral e uma outra de 57 kDa, que codifica para uma RNA polimerase-RNA dependente (Matsui & Greenberg, 2001).

Durante o processo de replicação e biossíntese viral no interior da célula hospedeira, há a produção de um RNA, subgenômico com aproximadamente 24 pb de tamanho, colinear a extremidade 3' do RNA genômico, o qual está envolvido na produção das proteínas estruturais (Monroe et al., 1991; Monroe

et al., 1993; Matsui & Greenberg, 2001). A região RLA 2 é encontrada nos dois tipos de RNA viral (genômico e subgenômico) próximo á extremidade 3' de ambos RNAs (Monroe et al., 1993; Lewis et al., 1994; Matsui & Greenberg, 2001). Esta região possui um produto primário, precursor do capsídeo viral, de aproximadamente 90 kDa, que é clivado para produzir uma proteína de 70 kDa a qual é montada dentro da partícula viral e que, na presença de tripsina, forma pelo menos três peptídeos menores com massas moleculares entre 26 a 34 kDa (Monroe et al., 1991; Sánchez-Fauchier et al., 1994; Bass & Qiu, 2000; Méndez et al., 2002).

### **2.3.4 Patogenia e manifestações clínicas**

A replicação dos astrovírus ocorre no citoplasma das células-alvo onde a adsorção das partículas virais junto a estas células parece ocorrer em receptores contendo ácido siálico. Admite-se que a penetração destas partículas nas células seja realizada através da membrana apical ou superfície basolateral por endocitose sendo internalizadas em vesículas celulares e, posteriormente, liberadas no citoplasma celular. Durante o processo de síntese do genoma viral, admite-se que a partir do RNA genômico viral de polaridade positiva, a RNA polimerase viral realiza a cópia de um RNA antígenômico de polaridade negativa, o qual atua como intermediário para a síntese final dos dois tipos de RNA (genômico e subgenômico), (Monroe et al., 1991; Monroe et al., 1993; Lewis et al., 1994; Matsui et al., 2001). Admite-se ainda, que o RNA subgenômico produzido em grandes quantidades e acumulado dentro do citoplasma celular, direciona a síntese das proteínas estruturais (Matsui & Greenberg, 2001; Santos 2002). Além disso, postula-se que a região que apresenta um alto grau de variabilidade da proteína NSP1a esteja envolvida na replicação do RNA viral (Guix et al., 2005).

Muito embora o mecanismo não seja ainda bem conhecido, admite-se a ocorrência de apoptose celular durante o processo de replicação de astrovírus.

Não obstante, um estudo realizado por Guix et al., 2004, empregando a linhagem celular CaCo-2 (células de adenocarcinoma de cólon humano), que analisou o processo de apoptose celular induzida por astrovírus tipo 4, mostra que nas células infectadas aspectos morfológicos e bioquímicos tais como condensação da cromatina celular, ativação de endonucleases celulares, fragmentação de DNA celular e formação de corpos apoptóticos, ocorram como sinais da resposta apoptótica celular frente a infecção pela cepa viral. Além disso, foi considerado que caspases, uma família de cisteína proteases, possam desempenhar uma função importante na resposta apoptótica durante o processo de infecção viral, principalmente a caspase 8 que pode levar a uma redução da infectividade da progênie viral e, ainda, que haja uma relação entre a indução de apoptose celular e as proteínas codificadas pela RLA1a (Mitchell, 2002).

A transmissão de astrovírus ocorre por contato direto de pessoas infectadas pelos vírus, pela água e alimentos contaminados ou, provavelmente, por fômites conseqüentes à rota fecal-oral (Matsui & Greenberg, 1996; Santos 2002). No caso da transmissão por água e alimentos contaminados, deve ser considerada a possibilidade de várias fontes de infecção, tais como fontes de água destinadas para consumo, água para recreação (piscinas e rios), água de esgoto contendo resíduos humanos, alimentos marinhos (ostras e moluscos), entre outros (Abad et al., 1997; Matsui & Greenberg, 2001; Walter & Mitche, 2003; Maunula et al., 2004).

Os aspectos sobre a patogênese da infecção causada por astrovírus em humanos são poucos conhecidos. Relatos de casos de diarreia relacionados a astrovírus em crianças, sugerem que a replicação viral ocorra em células epiteliais intestinais (Gray et al., 1980). Em outros estudos já foi identificada a presença de partículas virais no epitélio de biópsia duodenal e em macrófagos da lâmina própria de indivíduos com infecção sintomática pelos vírus (Phillips et al., 1982, Mitchell, 2002). Adicionalmente, estudos realizados em animais mostram agregados de partículas virais dentro de lisossomos celulares e vacúolos autofágicos, além de macrófagos contendo partículas virais e enterócitos demonstrando microvilosidades, degenerações nucleares e, conseqüentemente, mortes celulares, conduzindo a uma atrofia das vilosidades

intestinais e hipertrofia das criptas (Gray et al., 1980; Kurtz, 1988; Santos, 2002).

O período de incubação observado em infecções por astrovírus varia de um a quatro dias sendo que a enfermidade causada pelos vírus tende a ser branda e auto limitada e geralmente não resulta em significativo quadro de desidratação ou na necessidade de hospitalização. Tem sido observado que a infecção por estes agentes resulta em quadro de gastroenterite aguda, onde o sintoma típico é a diarreia aquosa, a qual pode persistir por dois a três dias. Além disso, pode haver associação a outros sintomas tais como vômito, febre, anorexia e dor abdominal que duram em média quatro dias (Greenberg & Matsui, 1992; Matsui & Greenberg, 2001; Mitchell, 2002; Walter & Mitchell 2003). A complicação maior que pode resultar da infecção por astrovírus é a desidratação, associada ou não a baixo estado nutricional ou infecção mista severa em casos de imunodeficiência (Matsui & Greenberg; 2001).

### **2.3.5 Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico laboratorial de infecções causadas por astrovírus é baseado na detecção de partículas ou do genoma viral, ou de antígenos virais em espécimes clínicos (fezes, swabs retais). Várias metodologias podem ser empregadas na detecção e caracterização destes vírus tais como, ME e IME, EIE, aglutinação em látex, isolamento viral empregando culturas celulares, assim como procedimentos moleculares, sendo que todas as técnicas têm as suas respectivas vantagens e desvantagens (Matsui & Greenberg, 2001; Santos, 2002; Mitchell, 2002; Tai et al., 2003; Walter & Mitchell, 2003; Wilhelmi et al., 2003).

A detecção de partículas de astrovírus em espécimes fecais empregando-se as técnicas de ME ou IME podem ser úteis na elucidação do diagnóstico viral. No caso da ME, trata-se de um procedimento rápido que não exige partículas virais viáveis, mas que requer alta concentração de vírus no espécime clínico (Madeley, 1993; Matsui & Greenberg, 2001; Rácz, 2004). Além disso, a ME é uma técnica que exige experiência e interpretação acurada por parte da pessoa responsável pelo procedimento (Rácz, 2004).

O desenvolvimento de EIEs, empregando anticorpos monoclonais ou policlonais, possibilitou aumento de sensibilidade na detecção de astrovírus em termos de diagnóstico laboratorial e na análise simultânea de um grande número de amostras (Herrmann et al., 1988; Herrmann et al., 1990; Lew et al., 1991; Moe et al., 1991; Glass et al., 1996; Shastri et al., 1998; Walter & Mitchell, 2003). Estes testes são mais sensíveis e específicos quando comparados às técnicas de ME e IME e, os produtos que utilizam anticorpos monoclonais grupo-reativos para capturarem antígenos virais, já são comercialmente disponíveis (Herrmann et al., 1990; Glass et al., 1996; Matsui & Greenberg, 2001; Mitchell, 2002).

Testes que empregam a aglutinação em látex têm sido desenvolvidos e são considerados procedimentos simples, rápidos, menos dispendiosos, com elevados índices de especificidade e permitindo também a análise de grande número de amostras (Komoriya et al., 2003).

O desenvolvimento de técnicas moleculares como a RT-PCR, hibridização (dot-blot, northern blotting e ensaio de hibridização líquida), NASBA (amplificação baseada em seqüência de ácido nucléico) e metodologias para genotipagem e seqüenciamento de astrovirus permitiram um grande avanço na detecção e caracterização do genoma destes agentes por serem métodos bastante sensíveis e específicos. Os testes de hibridização são procedimentos que fazem uso de sondas específicas e que demonstram eficácia no diagnóstico viral, agilidade e facilidade de execução (especialmente o ensaio de hibridização líquida), mas podem ser laboriosos e demandar tempo para sua realização, como no caso do Northern blotting e o dot-blot (Belliot et al., 2001; Tai et al., 2003).

A técnica de NASBA para detecção de astrovírus foi desenvolvida por Tai e colaboradores em 2003. Ficou demonstrado que esta metodologia apresenta índices semelhantes ou maior de sensibilidade quando comparada a RT-PCR. Contudo, os produtos derivados da NASBA podem ser mais instáveis e difíceis de serem trabalhados. Além destes aspectos, nesta técnica há a possibilidade de ocorrência de interações inespecíficas, além de inibidores nas amostras submetidas à análise que pode limitar assim o seu uso (Tai et al., 2003).

A RT-PCR é uma metodologia onde há a utilização de iniciadores que resultam na geração de produtos a partir das três regiões do genoma dos

astrovírus (Belliot et al., 1997b). Os iniciadores desenhados para a região RLA2 do genoma são atualmente empregados em larga escala para a detecção viral em estudos epidemiológicos (Noel et al., 1995; Mitchell, et al., 1999; McIver et al., 2000; Schnagl et al., 2002; Grimm et al., 2004). Essa é uma técnica que demonstra nível de sensibilidade maior quando comparada com os EIEs, embora seja vulnerável à contaminação de seus produtos e à presença de agentes inibidores, que podem resultar em resultados falso-negativos (Tai et al., 2003; Grimm et al., 2004).

Metodologias que empregam variantes da PCR como a nested-PCR são utilizadas na caracterização dos oito genótipos de astrovírus humanos com iniciadores também desenhados para as três regiões do genoma dos astrovírus, principalmente para a região RLA2 (Sakamoto et al., 2000; Oh & Schreier, 2001; Jakab et al., 2003).

Técnicas voltadas para o seqüenciamento genômico dos astrovírus têm sido utilizadas para se ter conhecimento sobre as seqüências parciais ou completas, dos genomas dos diferentes tipos de astrovírus existentes e demonstram a ocorrência de variações nucleotídicas nos genomas desses vírus. Visam também uma melhor compreensão sobre a evolução dos astrovírus nos seres humanos e nos animais (Méndez- Toss et al., 2000; Oh & Schreier, 2001; Lukashov & Goudsmit, 2002; Jakab et al., 2003).

O cultivo de astrovírus em linhagens celulares é outra metodologia que proporciona o isolamento e identificação viral. Muitas linhagens celulares têm sido empregadas no cultivo de astrovírus sendo que as mais utilizadas são as células de hepatoma de fígado humano (pLC/PRF/5), células HEK, células CaCo-2 e a linhagem contínua de células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) (Lee & Kurtz, 1981; Willcocks et al., 1990; Taylor et al., 1997; Silva et al., 2001; Santos, 2002). Estas últimas têm mostrado melhores resultados no cultivo celular de astrovírus, apesar de que bons resultados também vêm sendo obtidos com a utilização das células PLC/PRF/5, células de rim fetal de macaco verde africano (MA-104) e a linhagem contínua de células de carcinoma de cólon humano (T84) (Taylor et al., 1997, Brinker et al., 2000).

Uma combinação entre as técnicas de cultivo celular e RT-PCR, denominada de ICC/RT-PCR (reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa integrada ao cultivo celular) vem sendo empregada na

análise tanto de amostras humanas quanto do meio ambiente, a fim de permitir um aumento na detecção dos astrovírus (Mustafa et al., 1998; Chapron et al., 2000; Grimm et al., 2004).

### **2.3.6 Epidemiologia**

Os astrovírus são patógenos de distribuição mundial e, por alguns autores, como a segunda causa mais comum de gastroenterite viral, depois dos rotavírus, em bebês e crianças jovens hospitalizadas (Dennehy et al., 2001; Giordano et al., 2001; Rodriguez-Baez et al., 2002; Okitsu-Negishi et al., 2004).

Epidemias de diarreia associada à astrovírus já foram relatadas em berçários, escolas, creches, hospitais e outras instituições, como asilos (Silva et al., 2001; Walter & Mitchell, 2003). Surtos esporádicos de gastroenterite associados a estes vírus têm sido relatados entre militares (Belliot et al., 1997c), em comunidades rurais (Maldonado et al., 1998) e urbanas (Miranda et al., 2003). Além disso, surtos relacionados ao consumo de alimentos contaminados e atribuídos ao agente já acometeram centenas de crianças e adultos no Japão (Sakamoto et al., 2000).

Existem relatos de casos de pacientes imunocomprometidos hospitalizados (adultos e crianças), principalmente aqueles submetidos a transplante e pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana, que apresentam quadros diarreicos relacionados à astrovírus com períodos prolongados de excreção viral, geralmente, ocorrendo de semanas a meses, mesmo depois de providenciadas medidas de controle da infecção (Shastri et al., 1998; Cubitt et al., 1999; Treviño et al., 2001; Sebire et al., 2004).

A distribuição etária da infecção relacionada à astrovírus humanos varia de acordo com a localização geográfica e as condições demográficas da população (Walter & Mitchell, 2003). Geralmente, a faixa etária em que mais se observa infecção por este agente viral é a de crianças com menos de cinco anos de idade conforme demonstrado em estudos já realizados em vários países como França, Itália, Argentina, Colômbia e Venezuela (Medina et al., 2000; Giordano et al., 2001; De Grazia et al., 2004; Giordano et al., 2004).

Estudos de soroprevalência também têm demonstrado que até 90% das crianças situadas dentro desta faixa etária já foram infectadas por este enteropatógeno (Mitchell, 2002).

A associação de casos de gastroenterite aguda relacionada à astrovírus em crianças vem sendo evidenciada por meio de estudos realizados em países asiáticos como China, Paquistão e Japão, assim como na Oceania (Austrália) com índices de detecção de 4 a 11% (Schnagl et al., 2002; Liu et al., 2004; Phan et al., 2004). Em países do continente europeu como Itália, Espanha, França, Alemanha e Irlanda a estimativa é de 3 a 7% (Foley et al., 2000; De Grazia et al., 2004), enquanto que países africanos como Nigéria, Botsuana, Malawi, Gana e África do Sul os índices são de 2 a 9% (Cunliffe et al., 2002; Payer & Steele, 2002; Pennap et al., 2002; Basu et al., 2003). Nos Estados Unidos, episódios diarréicos em crianças associados à astrovírus têm sido demonstrados em 3 a 10% dos casos analisados (Shastri et al., 1998; Denno et al., 2005).

Na América Latina, em países como Chile, Colômbia, Venezuela e Argentina, a ocorrência de astrovírus varia de 4 e 17% segundo estudos realizados em crianças que receberam atendimento em hospitais, ambulatórios e creches (Gaggero et al., 1998; Medina et al., 2000; Giordano et al., 2001), ou ainda, em crianças de comunidade periurbana no México (Walter et al., 2001).

Estudos realizados no Brasil mostram índices de detecção de astrovírus de 3 a 11 % em casos de gastroenterite aguda (Cardoso et al., 2002; Costa et al., 2004; Miranda et al., 2004). Um dos primeiros estudos relatando a ocorrência de casos de diarreia aguda associada à astrovírus foi feito por Stewien et al. 1991, onde 3% das amostras fecais analisadas, provenientes de 67 crianças hospitalizadas e que residiam na cidade de São Paulo, mostraram positividade para este agente viral. Um outro estudo, realizado também no Estado de São Paulo mostrou a ocorrência de um surto de gastroenterite intrafamiliar causado por astrovírus através da identificação destes em amostras fecais de cinco crianças da família (Tanaka et al., 1994).

Ainda, estudo desenvolvido por Gabbay et al., (2000), analisando espécimes fecais provenientes de crianças residentes na cidade de Belém, mostrou a presença de astrovirus em até 5% das amostras analisadas. Por outro lado, estudos realizados na cidade de São Paulo e numa pequena

comunidade próxima a cidade do Rio de Janeiro constataram a ocorrência de surtos de gastroenterite aguda relacionados aos astrovírus com índices de positividade viral em até 62 % das amostras fecais analisadas (Castilho et al., 2003; Miranda et al., 2003).

Na região Centro Oeste, em Goiânia, Cardoso et al. em 2002 encontraram 2,8% de crianças com diarreia, positivas para astrovírus, os quais pertenciam ao sorotipo 1. Santos et al., 2007, encontraram 3,0% de astrovírus em crianças de até 5 anos de idade, hospitalizadas com diarreia aguda em Goiânia e 7,0% em Brasília Andreasi e col em 2008, encontraram 3,1% de astrovírus em crianças com gastroenterite aguda em Campo Grande (MS).

A sazonalidade das infecções atribuídas aos astrovírus parece variar de acordo com região geográfica. Estudos realizados na Europa, Austrália e Argentina mostraram que há um aumento na incidência da infecção viral durante os meses mais frios do ano (Mustafa et al., 2000; Giordano et al., 2001; Guix et al., 2002; Marie-Cardine et al., 2002), enquanto que em alguns países como Egito e México, a maioria das infecções pelo agente viral ocorre durante a época mais quente do ano (Naficy et al., 2000).

Dentre os oito sorotipos/genotipos de astrovírus conhecidos, atualmente, o HASTV-1 é o tipo mais prevalente em vários países, seguido pelos HASTV-2, HASTV-3, HASTV-4 e HASTV-5, sendo os outros: HASTV-6, HASTV-7 e HASTV-8 os menos detectados (Gaggero et al., 1998; Koopmans et al., 1998; Medina et al., 2000; Oh & Schreier, 2001; De Grazia et al., 2004).

### **2.3.7 – Imunidade**

Os aspectos determinantes sobre a imunidade de astrovírus não são bem compreendidos. Infecções sintomáticas por estes vírus são observadas, principalmente em crianças jovens e idosos (Wilhelmi et al., 2003). Estudos em voluntários adultos indicam que níveis detectáveis de anticorpos específicos em soros dessas pessoas impedem reinfecções relacionadas aos agentes (Kurtz et al., 1979; Matsui & Greenberg, 2001).

Esta distribuição bifásica de infecções sintomáticas sugere que anticorpos adquiridos nos primeiros anos de vida conferem proteção contra a enfermidade ocasionada por este agente viral até a fase adulta e que a imunidade relacionada a estes vírus tende a diminuir em pessoas com idade mais avançada (Matsui & Greenberg, 2001).

### **2.3.8 Tratamento, prevenção e controle**

Ainda não existe terapia antiviral e vacina disponível para os astrovírus humanos. A gastroenterite aguda atribuída aos astrovírus, geralmente não requer utilização de uma terapia específica, apenas em alguns casos pode ser necessária hidratação e reposição de eletrólitos (via oral ou intravenosa) (Matsui & Greenberg, 2001; Mitchell, 2002; Walter & Mitchell, 2003). No caso de paciente imunocomprometido, que não responde de maneira adequada às medidas terapêuticas convencionais, pode ser útil a administração de imunoglobulina intravenosa (Yuen et al., 1998).

As medidas que visam controlar e prevenir epidemias de gastroenterite viral associada à astrovírus deve ter como foco a minimização das fontes de infecção do agente, tais como o controle de indivíduos doentes que sejam manipuladores de alimentos, impedimento da contaminação de suprimentos de água, além da interrupção da transmissão por contatos diretos com pessoas infectadas pelos vírus (Walter & Mitchell, 2003). Procedimentos adequados de higiene pessoal devem ser reforçados em hospitais e creches (Matsui & Greenberg, 2001). Medidas efetivas e apropriadas de isolamento de crianças que apresentam quadros diarreicos graves além de pacientes imunocomprometidos são fundamentais para a prevenção de infecções nosocomiais (Walter & Mitchel, 2003).

## 2.4 CALICIVÍRUS

### 2.4.1 Histórico

A primeira doença associada aos calicivírus humanos (HuCV) foi descrita em 1929, por Zahorsky, que a denominou de “*winter vomiting disease*”, porém na época não foi atribuído aos sintomas nenhum agente etiológico. Na década de 40, estudos realizados nos Estados Unidos mostraram que 75% dos casos de gastroenterite não eram associados a bactérias ou parasitas (Gordon et al., 1947). Filtrados de amostras de fezes, provenientes de casos diarréicos, os quais não continham bactérias, foram inoculados em voluntários e, com a reprodução da doença, passou-se a admitir que os vírus, também eram responsáveis pela síndrome (Gordon et al., 1947; Hodges et al., 1956).

Em 1968, um surto de gastroenterite caracterizado, principalmente, por náusea, vômito e dor abdominal ocorreu em uma escola em Norwalk, nos EUA, onde 50% dos estudantes e professores desenvolveram a doença, que apresentou um período de incubação de 48 horas e duração de 24 horas semelhante à síndrome descrita por Zahorsky, em 1929. Estudos laboratoriais, realizados na ocasião, não conseguiram detectar o agente etiológico (Adler & Zickl 1969). Na década de 70, em um estudo conduzido com voluntários, de três indivíduos inoculados com filtrados de amostras fecais, dois desenvolveram gastroenterite. A caracterização mostrou que o agente era pequeno (36 nm), resistente ao éter, a ácidos e à temperatura moderada (Dolin et al., 1971; Dolin et al., 1972).

Em 1972, Kapikian e colaboradores observaram, por IME, uma partícula de 27 nm em suspensões fecais obtidas de casos de doença gastroentérica, ocorrida em 1968, a qual foi denominada agente Norwalk. Posteriormente, foram encontrados outros agentes relacionados, os quais foram nomeados a partir do lugar de sua descoberta (Caul, 1996). Em 1976, também a partir de casos de gastroenterite, outros vírus foram identificados por ME, e admitidos

como agentes infecciosos para o homem e causadores de infecção. Um dos primeiros vírus encontrado foi nomeado Sapporo vírus, a partir de sua identificação em um surto de gastroenterite em uma creche em Sapporo, no Japão, em outubro de 1977. Posteriormente, outros surtos foram associados ao Sapporo vírus, confirmando-o como um patógeno entérico humano (Lopman et al., 2002).

#### **2.4.2 Classificação taxonômica**

A denominação de família *Caliciviridae*, para os calicivírus, foi sugerida pela primeira vez pelo III Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV), em 1979. Em 1995, foi publicada a classificação pelo V ICTV, na qual todos os vírus da família *Caliciviridae* foram colocados em um único gênero, Calicivírus (Green et al., 2000).

Um grupo de estudo, formado em 1997, propôs um novo sistema para nomenclatura e classificação dos calicivírus ao ICTV para 1998. Nesta proposta, foi sugerida a retirada do vírus da Hepatite E da família *Caliciviridae* e a criação de quatro gêneros com suas espécies protótipos: o gênero *Vesivirus*, com a espécie protótipo *Vesicular exanthema of swine virus*; *Lagovirus*, com a espécie *Rabbit hemorrhagic disease virus*; *Norwalkvirus*, com a espécie *Norwalk virus*, e o gênero *Sapporovirus*, com a espécie *Sapporo virus*. O VII ICTV manteve a proposta de retirada do vírus da hepatite E da família *Caliciviridae* e a divisão da família em quatro gêneros, com suas espécies tipo. No entanto, os nomes dos gêneros *Norwalkvirus* e *Sapporovirus* foram rejeitados. Estes gêneros foram provisoriamente denominados *Norwalk-like virus* (NLVs) e *Sapporo-like virus* (SLVs) (Green et al., 2000). Após, publicou-se a classificação atual da família *Caliciviridae* que, baseada em características genômicas, é composta por quatro gêneros: *Norovirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus* e *Vesivirus*. Os vírus dos gêneros *Lagovirus* (LaV) e *Vesivirus* (VeV) são, até o momento, exclusivos de animais, enquanto os vírus dos gêneros *Norovirus* (NV) e *Sapovirus* (SV) infectam seres humanos (ICTV, 2005).

Considerando-se a grande diversidade genômica, o gênero *Norovirus* comporta a espécie *Norwalkvirus* como vírus protótipo e os isolados: Desert Shield vírus, Lordsdale vírus, Mexico virus, Hawai vírus, Snow Mountain virus e Southarnpton vírus. O gênero *Sapovirus* comporta a espécie protótipo *Sapovirus* e os isolados: Houston/86, Houston/90, London 29845, Manchester virus, e Parkville virus (ICTV, 2005).

Farkas et al. (2004), baseados na análise filogenética de 17 seqüências obtidas para a região do capsídeo viral, sugerem a classificação, para o gênero *Sapovirus*, em nove grupos genéticos dentro de cinco genogrupos: genogrupo I/1, Sapporo/82 como amostra protótipo, Houston/86, Plymouth/92, Manchester/93, Lyon 30388/98; Genogrupo I/2, Parkville/94 como amostra protótipo e Houston/90; Genogrupo I/3, Stockholm/97 e Mexico 14917/00; Genogrupo II/1, London/92, Lyon 598/97 e Bristol/98; Genogrupo II/2 Mexico 340190; Genogrupo II/3, Cruise ship/OO; Genogrupo III, PEC/Cowden (origem animal); Genogrupo IV, Houston 7-1181/90 e Genogrupo V, Argentina 39.

### **2.4.3 Características da partícula viral**

Os calicivirus são vírus esféricos, pequenos, com um diâmetro de 27 a 40 nm, não envelopados. O capsídeo é composto por um único tipo de proteína e exibe uma simetria icosaédrica, com 180 moléculas protéicas organizadas em 90 dímeros que formam dois domínios, o domínio S e o domínio P. O domínio S forma a parte interna do capsídeo, que envolve o genoma RNA, e o domínio P, dividido em subdomínios P1 e P2, formam uma arquitetura característica pela ME em forma de cálice. O domínio P confere o tamanho da partícula e tem função na estabilidade do capsídeo, além de ser imunogênico (Prasad et al., 1999; Green et al., 2000; Bertolotti-Ciarlet et al., 2002).

A comparação de seqüências entre as proteínas do capsídeo de diferentes amostras de calicivirus humanos indica que o domínio S, entre os resíduos 30 e 250, representa a região mais conservada da seqüência. Embora o subdomínio P1 seja moderadamente conservado, observa-se alta variabilidade em parte da seqüência entre os resíduos 280 e 400 do

subdomínio P2, que é a região mais exposta da estrutura. Estudo utilizando capsídeo recombinante de vírus Norwalk, produzido em baculovírus, mostrou que anticorpos monoclonais específicos, reconhecem uma região entre os resíduos 300 e 384 do subdomínio P2, o que leva à inibição da ligação a células, sugerindo que o subdomínio P2 está envolvido na atividade de adsorção celular (White et al., 1996; Prasad et al., 1999; Prasad et al., 2000).

Os calicivírus apresentam um genoma RNA de fita simples de polaridade positiva. Em sua porção 5' existe uma proteína viral e na porção 3' há uma cauda poliadenilada. No terminal 5' são codificadas proteínas não estruturais, enquanto no terminal 3' do genoma são codificadas proteínas estruturais (Jiang et al., 1993; Clark & Lambden, 2000; Meyers, 2003).

A organização genômica dos calicivírus é diferente entre os gêneros. Nos membros dos gêneros *Norovirus* e *Vesivirus*, o genoma é organizado em três regiões de leitura aberta (RLA1, RLA2 e RLA3), sendo a proteína estrutural do capsídeo codificada na RLA2, uma região separada daquela que codifica para poliproteína não-estrutural (RLA1). O genoma dos gêneros *Sapovirus* e *Lagovirus* é organizado em apenas duas regiões de leitura aberta (RLA1 e RLA2), sendo a poliproteína não-estrutural e a proteína do capsídeo codificadas em uma mesma região, a RLA1 (Green et al., 2000; Koopmans et al., 2002).

A poliproteína codificada pela RLA1 varia de tamanho (1680 -1881 aminoácidos) nas diferentes espécies de calicivírus. Nos norovirus, esta poliproteína, por clivagem, gera três proteínas: 2C helicase, 3C proteinase e a 3D RNA polimerase, que são análogas às dos picornavírus. A RLA2 codifica para um só tipo de proteína a VP60, de 58 KDa e 550 aa, que forma o capsídeo viral. Esta proteína parece ter também um papel importante na replicação e montagem do vírus. A RLA3 destes vírus corresponde à RLA2 dos sapovirus e é considerada a região mais variável do genoma. Codifica para uma pequena proteína estrutural, a VP1, que é básica, de tamanho variável e que, possivelmente, tem função de encapsidar o RNA viral e regular a montagem da estrutura do vírus (Jiang et al., 1993; Prasad et al., 1999; Glass et al., 2000; Clark & Lambden, 2001).

Os sapovírus humanos, com exceção da amostra London/92, contêm uma RLA com sobreposição na extremidade que codifica o gene do capsídeo, que

não é encontrada no genoma dos norovírus. A presença de uma região conservada de iniciação para tradução no final 5' desta RLA, GCAAUGG, sugere que uma proteína funcional possa ser codificada nesta região (Farkas et al., 2004).

Os calicivírus são considerados resistentes a pH ácido, em função de sua habilidade em permanecerem infecciosos após passagem pelo estômago (Dolin et al., 1972).

#### **2.4.4 Patogenia e Manifestações clínicas**

Os calicivírus penetram no organismo humano predominantemente pela via oral, principalmente através da ingestão de alimentos e água contaminados, que se constituem os veículos mais comuns para a transmissão desses vírus, podendo ocorrer também através do contato pessoa-pessoa ou mesmo por aerossóis produzidos durante o vômito (Becker et al., 2000; Marks et al., 2000; Billgren et al., 2002; Koopmans et al., 2002; Lopman et al., 2002; Sair et al., 2002).

Uma ingestão 10 partículas virais ou menos apresentam um infectividade de cerca de 50% dos indivíduos inoculados (Glass et al., 2000).

O sítio primário de replicação dos calicivírus no organismo humano não é bem conhecido, mas admite-se que este possa ser a porção jejunal do intestino delgado, em função da observação de ocorrência de desorganização das células epiteliais, achatamento das vilosidades intestinais, vacuolização do citoplasma e infiltração da lâmina própria por células mononucleares observadas nesse local (Agus et al., 1973; Dolin et al., 1975; Caul et al., 1996).

Estudos realizados em voluntários têm mostrado que a infecção por calicivírus humanos (HuCV) é autolimitada, apresenta um período de

incubação de 24 a 48 horas e curso que pode variar de horas a vários dias (Cubitt et al., 1979; Daniels et al., 2000). Para norovírus, a média de doença sintomática foi estimada em um a dois dias e para os sapovirus em cinco a seis dias (Atmar et al., 2008). Estes vírus são excretados nas fezes em baixas concentrações, sendo sua excreção iniciada 15 horas após a inoculação, com um pico de excreção de 25-72 horas. A excreção de norovírus pode ocorrer até três semanas após os sintomas da doença, enquanto para os sapovirus este tempo é menor, com duração de até 14 dias (Kaplan et al., 1982a; Kaplan et al., 1982b; Parashar et al., 1998; Murata et al., 2007).

A doença por calicivirus é caracterizada por náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia, cefaléia e febre. Embora estes sintomas sejam vistos em pacientes de todas as faixas etárias, o vômito é mais freqüente entre as crianças, enquanto a diarreia é mais freqüente entre adultos. A presença de febre é mais comum entre os infectados por sapovirus (Meeroff et al., 1980; Kaplan et al., 1982; Pang et al., 1999; Atmar et al., 2008).

Estudos sugerem que complicações clínicas por norovírus podem ocorrer em crianças e idosos, devido à maior sensibilidade ao comprometimento hidroeletrolítico. Ainda, em situações de grande estresse ou em indivíduos imunocomprometidos, a infecção pode ser mais grave ou persistir por um tempo mais prolongado. Em pacientes transplantados por até dois anos (Nakata et al., 1998; Chris, 2003; Nilsson et al., 2003).

Rodriguez Guillen e colaboradores em 2005 estudaram a associação da infecção por calicivirus em crianças e adultos portadores do HIV e observaram que os calicivirus são importantes patógenos oportunistas em crianças soropositivas para o HIV, mas não nos adultos também portadores do HIV.

Estudos realizados com vírus Norwalk sugerem que alguns fatores relacionados ao hospedeiro podem estar envolvidos na questão de suscetibilidade e resistência a infecção por esses vírus. O primeiro deles seria o grupo sanguíneo, no qual indivíduos do grupo B têm sido mostrados como menos suscetíveis aos vírus, enquanto os do grupo O são os mais suscetíveis à infecção (Lindesmith et al., 2003). Outro fator admitido é a expressão ou não do gene FUT 2, que codifica a enzima fucosiltransferase, que leva a produção de carboidrato H tipo 1, encontrado na superfície das células epiteliais do trato gastrointestinal e em secreções de mucosa. Nesse processo, as células que

apresentam antígeno H seriam as células receptoras para os vírus. Admite-se que esta molécula aumenta a suscetibilidade das células gastrintestinais para infecção. Por outro lado, tem sido mostrado que indivíduos resistentes à infecção pelo vírus Norwalk podem ser suscetíveis a outros calicivírus (Hutson et al., 2003; Lindesmith et al., 2003). Estas moléculas também foram identificadas em células sanguíneas, principalmente de indivíduos do grupo sanguíneo O. Em cerca de 20% de indivíduos brancos não produzem o carboidrato H tipo 1, e estes tem sido resistentes à infecção pelos vírus Norwalk (Lindesmith et al., 2003).

### **2.4.5 Epidemiologia**

São os principais agentes etiológicos das gastroenterites agudas epidêmicas não bacterianas no mundo. Os norovírus infectam indivíduos de todas as faixas etárias, uma característica que os distingue de outros vírus causadores de gastroenterite, como os rotavírus, astrovírus e adenovírus, que infectam, preferencialmente, crianças de até cinco anos de idade (Glass et al., 2000). A infecção primária geralmente ocorre cedo na infância, em países em desenvolvimento, sendo elevados os índices de soroprevalência na vida adulta. Estes vírus frequentemente causam surtos de gastroenterite associados com água e alimentos contaminados, provocando diarreia grave. Admite-se que os sapovírus infectam principalmente crianças e, geralmente, são associados com diarreia branda, não obstante a ocorrência de alguns casos graves (Pang et al., 2000; Sakai et al., 2001).

Têm sido sugeridos dois padrões epidemiológicos para os norovírus: um deles levaria à infecção endêmica, como foi observado com os vírus Grimsby no Reino Unido; o outro padrão é o de infecção epidêmica, o que foi observado com o vírus Norwalk, no México (Buesa et al., 2002).

Em estudos realizados em 33 estados dos Estados Unidos, Frankhauser et al. 1998 definiram as características epidemiológicas de 90 surtos de

gastroenterite não bacteriana em diferentes ambientes. Observou-se que os surtos eram mais comuns em asilos (43%) e restaurantes (26%). O modo de transmissão mais comum foi a partir de alimentos (37%), água (6%) e contato direto pessoa-pessoa (20%). Os achados foram semelhantes aos obtidos em outras regiões do mundo (Hedlund et al., 2000).

Pode ocorrer a transmissão do vírus através do contato pessoal ou mesmo por aerossóis produzidos durante a tosse e vômitos. Esta situação viabiliza as transmissões nosocomiais, nas escolas, creches, serviços militares e asilos (Koopmans et al., 2002).

Estudos de soroprevalência têm fornecido informações sobre a epidemiologia dos calicivírus e identificado os principais grupos de risco para a infecção. Estes estudos indicam que a aquisição de anticorpos para os HuCV aumentam com a idade, alcançando índices de 90% entre adultos em diferentes países do mundo. Em países em desenvolvimento, a aquisição de anticorpos ocorre mais precocemente que em países desenvolvidos (Cubitt et al., 1994; Lewis et al., 1994; Honrna et al., 1998; Nakata et al., 1998).

Não tem sido observada uma correlação absoluta entre a alta prevalência de anticorpos para norovírus ou sapovírus e o alto índice de detecção viral. Algumas explicações têm sido sugeridas para esse fato, tais como: 1) a possibilidade de que a doença autolimitada não necessite visita médica; 2) a não solicitação, por parte dos profissionais médicos, de exames para pesquisa do vírus; 3) a indisponibilidade de métodos diagnósticos práticos para a detecção dos vírus e 4) a falta de padronização dos métodos de detecção do vírus (Nakata et al., 1998; Nakata et al., 2000; Koopmans et al., 2000).

Por outro lado, foi observado que a aquisição de anticorpos para HuCV ocorre tanto em casos de infecção sintomática, quanto não sintomática; ainda, de 40 a 50% das infecções sintomáticas em crianças, os agentes predominantes são do genogrupo II (GII) dos norovirus (Pang et al., 1999; Buesa et al., 2002), muito embora prevalência semelhante para ambos os gêneros tenha sido observado no Japão e outras partes do mundo (Nakata et al., 2000). A razão das amostras GII de norovirus serem predominantes sobre as amostras GI é desconhecida; porém, acredita-se que propriedades biológicas, como virulência, rotas de transmissão e estabilidade no ambiente sejam explicações possíveis (Lopman et al., 2003; Lopman et al., 2004).

Buesa et al., 2002 observaram uma prevalência de 14,19% para calicivírus humanos na Espanha, enquanto outros pesquisadores observaram diferentes índices de detecção: 14% em Dijon, na França (Bon et al., 1999); 9% em Melbourne, na Austrália (Kirkwood & Bishop 2001) e 6,5% no Reino Unido (Tompkins et al., 1999).

A infecção por calicivírus humanos tem sido observada durante todos os meses do ano, embora com maior circulação dos vírus no inverno e em regiões de clima frio. A rapidez com que estes vírus são disseminados na população e sua transmissão mais freqüente nos meses frios sugerem que eles possam ser transmitidos através do ar, como uma rota secundária de transmissão (Sawyer et al., 1988; Mounts et al., 2000). Lopman e colaboradores em 2004, em estudo desenvolvido na Europa, observaram uma variação na sazonalidade de uma amostra mutante do GII, que foi responsável por casos de um surto ocorrido em 2002, que foi detectado, pela primeira vez em janeiro daquele ano e com um pico atípico na primavera (Lopman et al., 2004).

Na região Centro Oeste, Borges et al., em 2006, encontraram 8,6% de calicivírus em crianças com gastroenterites, provenientes de Goiânia e Brasília, sendo mais prevalente em crianças de Goiânia (11,6%) do que de Brasília (1,9%). Andreasi et al. em 2008, relatou 7,6% de calicivírus em crianças de Campo Grande (MS) com até 3 anos de idade, apresentando diarreia.

#### **2.4.6 Diagnóstico laboratorial**

Diferentes procedimentos têm sido adotados para o diagnóstico de calicivírus humanos. Esses vírus são considerados de difícil cultivo e, até o momento, não existe modelo animal para os mesmos, bem como cultura celular sensível o suficiente para o cultivo viral. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado pelas técnicas:

ME: devido à impossibilidade de propagação dos calicivírus humanos em cultura de células, a ME foi fundamental na distinção morfológica dos vírus causadores de gastroenterite, considerando a sua superfície em forma de cálice. O diagnóstico pela ME, atualmente, tem sido pouco

utilizado, considerando-se a exigência de um número mínimo de partículas de vírus ( $10^5 - 10^6$  partículas de vírus por mL), nos espécimes fecais para a observação (Koopmans et al., 2002), e eventualmente uma pequena quantidade de partículas virais são excretadas, o que torna outros procedimentos metodológicos mais eficazes;

IME: este ensaio possui vantagem sobre a ME em função de sua maior sensibilidade de detecção viral ( $10^4$  partículas virais/mL) e, ainda, por permitir a identificação do vírus a partir da utilização de soro padrão específico. Algumas modificações deste método, como a imunomicroscopia de fase sólida, também tem sido utilizada para a detecção destes vírus. A IME pode também ser utilizada para a detecção de anticorpos, sendo este um método específico reproduzível, porém trabalhoso e que consome muito tempo na sua execução (Estes et al., 2001).

Hemaglutinação por imunoaderência (IAHA): este ensaio foi desenvolvido para avaliar o nível de anticorpos em estudo de soroprevalência. Para este fim a IAHA é um ensaio sensível e específico, requerendo pouca quantidade de antígeno; entretanto, não é eficiente para a detecção de antígeno nas fezes, devido à presença de hemaglutininas não específicas nesse espécime clínico, exigindo a utilização de antígeno, pelo menos, parcialmente purificado (Greenberg e Kapikian, 1978);

EIE: estes utilizam-se soros hiperimunes obtidos em animais de laboratório infectados com calicivírus animais. São simples e de uso em grande escala nos estudos epidemiológicos. Contudo, para calicivírus humanos, os EIEs são menos efetivos em função da diversidade molecular desses vírus, o que leva a uma baixa detecção de antígenos e à necessidade de um painel de antisoros hiperimunes para múltiplos tipos antigênicos dos HuCVs (Chiba et al., 2000). Para o desenvolvimento de imunoenaios mais eficazes, maior produção de antígenos recombinantes do capsídeo, representando mais tipos antigênicos, são necessários para a detecção de resposta imune homóloga (Jiang et al., 2000). Não obstante, os EIEs têm sido desenvolvidos para detecção de antígenos para norwalk virus em amostras de fezes, sendo considerado um ensaio

com sensibilidade similar ao radioimunoensaio e tendo, ainda, a vantagem de oferecer maior estabilidade dos reagentes utilizados e a não utilização de radioisótopos (Chiba et al., 2000; Jiang et al., 2000; Richards et al., 2004).

Desde a década de 90, com a disponibilidade de técnicas moleculares de amplificação, sequenciamento e expressão genômica, tem sido possível a caracterização genômica e antigênica dos calicivírus humanos. Dentre as metodologias disponíveis, destacam-se:

a) RT-PCR: tem tido larga aplicação no diagnóstico de infecção por calicivírus a partir da detecção do genoma em amostras clínicas e ambientais (Parashar et al., 1998). O seqüenciamento completo de algumas amostras de calicivírus humanos tem permitido a utilização de pares de iniciadores específicos para genogrupos individuais e a genotipagem das amostras. Em comparação com a ME, a RT-PCR é um método mais eficaz na detecção viral, se considerada a pequena quantidade de material viral necessária no espécime clínico, bem como o período de maior sensibilidade de detecção viral pós-infecção (Parashar et al., 1998).

Os pares de iniciadores mais utilizados na RT-PCR são aqueles desenhados a partir do gene para RNA polimerase viral, por ser esta uma região conservada no genoma dos calicivírus (Ando et al., 1995; Green et al., 1995; Jiang et al., 1999). Outras regiões do genoma, como as que codificam para o capsídeo viral, para a helicase ou mesmo a região da RLA1, são também utilizadas para desenho dos iniciadores específicos (Vainio et al., 2001). O uso da RT-PCR para a amplificação do material genômico tem revelado a extrema diversidade destes vírus e a dificuldade em desenvolver um sistema de detecção que englobe todos os calicivírus, sendo, portanto, aconselhável utilizar de múltiplas áreas do genoma como alvo para os iniciadores, ampliando, assim, a chance de detecção viral (Green et al., 1995; Estes et al., 2001).

b) A PCR em tempo real também utilizada no diagnóstico dos calicivírus, identifica o RNA alvo com maior sensibilidade, uma vez que a detecção da amplificação é feita através da captação de fluorescência. Esta técnica apresenta também maior especificidade devido à utilização de uma sonda específica para o fragmento alvo na reação. A amplificação e a detecção do

DNA são realizadas simultaneamente em um sistema fechado, dispensando procedimentos adicionais como a corrida eletroforética dos produtos em gel de agarose e fotodocumentação. Com a eliminação destas etapas, os resultados são obtidos mais precocemente pela PCR em tempo real quando comparada à convencional. Trata-se de método automatizado e que permite uma análise quantitativa (Richards, 2004).

c) Ensaio de hibridização: este ensaio tem a vantagem de confirmar o diagnóstico por PCR. A desvantagem do mesmo é o número de sondas específicas necessárias para hibridizar os vários genótipos de calicivírus (Maunula et al., 1999).

d) Ensaio de mobilidade heteroduplex (HMA): este ensaio tem sido utilizado para a identificação de ácido nucléico como uma alternativa ao sequenciamento, por ser mais rápido e menos oneroso (Mattick et al., 2000). O ensaio mostra a heterogeneidade genômica entre duas amostras de vírus, uma amostra teste e uma amostra referência. Os dois amplicons obtidos por PCR de moléculas de DNA heteroduplex são formados quando amplicons divergentes são misturados e submetidos à desnaturação pelo aquecimento e anelamento. Estes amplicons apresentam redução na mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida, comparada ao homoduplex do mesmo tamanho. O procedimento é simples e rápido, e serve como ferramenta para a observação de divergência genética entre amostras do mesmo vírus (Delwart et al., 1993).

#### **2.4.6 Prevenção e controle**

O mecanismo de infecção e imunidade para os HuCVs é pouco conhecido, e tem sido feito basicamente por intermédio de estudos com Norwalk vírus (Lindesmith et al., 2003).

Os calicivírus induzem a uma imunidade fugaz, considerando estudos realizados com reinfecção por um mesmo sorotipo, onde se observa uma imunidade de seis a quatorze semanas. O norovírus induzem uma imunidade heterotípica de curta duração e homotípica duradura, com base em infecção experimental (Dolin et al., 1972; Wyn-Jones et al., 2000; Rodríguez-Guillén et

al., 2005). Nas infecções por calicivírus, tem sido observado tanto a produção de IgA secretora, quanto de IgG sérica. Apesar da produção desta última, parece que é a presença da IgA de mucosa que confere resistência ao vírus. Fatores não imunológicos na resistência à infecção por norovírus foram observados a partir de estudos realizados em voluntários, onde se determinou o nível de anticorpos no soro e jejuno de indivíduos infectados. Nestes estudos, as médias geométricas de títulos de anticorpos no soro e fluido jejunal não foram correlacionadas com resistência à doença. Pelo contrário, indivíduos que desenvolveram a doença tinham uma média de títulos de anticorpos no fluido jejunal e no soro bem mais elevado do que os indivíduos que não se tornaram doentes. Uma das explicações sugeridas é a da possibilidade da existência de variabilidade genética determinada pelos receptores virais no trato intestinal, o que conferiria uma resistência à infecção, na ausência de anticorpos (Parrino et al., 1977, Greenberg et al., 1978; Baron et al., 1984; Lindesmith et al., 2003).

A compreensão dos mecanismos precisos da transmissão viral é necessária para uma prevenção eficaz da infecção por estes agentes. Os calicivírus são altamente infecciosos, podendo ser transmitidos por meio do alimento de três formas típicas: contaminação por ostras, por manipuladores de alimento contaminados ou ainda por água de irrigação e/ou na lavagem de frutas e vegetais (Greening et al., 2001; Lopman et al., 2002; Lopman et al., 2004). A lavagem efetiva das mãos e a desinfecção de material contaminado podem diminuir a transmissão intrafamiliar ou em instituições. Outro fator importante na prevenção deste patógeno é um efetivo tratamento da água potável (Lopman et al., 2004).

Os norovírus constituem a segunda causa não bacteriana de gastroenterite no mundo. Muitos portadores do vírus são assintomáticos, porém são potenciais transmissores de pessoa a pessoa. As “vírus-like particles” (VLP) similares ao fragmento do capsídeo viral, produzidas em maior escala utilizando o sistema de baculovírus, através de técnicas recombinantes constituem uma alternativa segura para o desenvolvimento de vacina contra os norovírus. Estas partículas são antigenicamente similares ao vírus nativo, porém desprovidos de ácido nucléico e conseqüentemente, incapazes de

causar doença. Elas são estáveis em baixo pH, portanto podendo ser utilizada através da via oral (Souza et al., 2007; Lindesmith et al., 2003).

### **3. JUSTIFICATIVA**

A importância epidemiológica das diarreias virais em recém nascidos ampliou a preocupação com a presença de infecção na gestante, relacionando-a com a possível transmissão vertical e, principalmente, com a via de transmissão oro - fecal, diante de uma mãe (cuidadora do recém nascido) contaminada por gastroenterovirus.

No exercício profissional em clínica obstétrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, tem sido observado uma aparente associação entre malformações congênitas e morte neonatal e o diagnóstico laboratorial de infecção materna e do feto por vírus. Trabalho de dissertação de Mestrado apresentado pelo autor da presente tese (Ferreira, 2005), feito sobre a infecção da gestante por citomegalovirus, reforçou sua percepção clínica em relação à importância das infecções virais na gestação, que comprometem a viabilidade e a qualidade de vida do produto da concepção.

- Considerando que os vírus gastroentéricos (rotavírus, adenovírus entéricos, astrovírus e calicivírus humanos) constituem a causa isolada mais importante de gastroenterite em crianças com até cinco anos de idade, em todo o mundo;
- Considerando que a infecção neonatal não impede a ocorrência de re-infecção;
- Considerando que os indivíduos com deficiência do sistema imunitário (humoral e/ou celular) possam ser mais susceptíveis ao desenvolvimento destas gastroenterovirose;
- Considerando que as mulheres grávidas e os indivíduos portadores de HIV se encontram em condição de especial vulnerabilidade às infecções virais;
- Considerando ainda a fragilidade das referências bibliográficas disponíveis sobre o tema no Brasil,

O presente trabalho se propõe detectar rotavírus, adenovírus, calicivírus e astrovírus em mulheres, gestantes e não gestantes portadoras ou não do vírus HIV, buscando associação destas gastroenterovirose com processos que diminuem a capacidade imunológica individual.



## **4. OBJETIVOS**

---

- Identificar a presença de vírus gastroentéricos (*rotavirus*, *adenovirus*, *astrovirus* e *calicivirus*) em mulheres atendidas no serviço de ginecologia e obstetrícia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) em Goiânia, Goiás.
- Buscar associação entre a presença destes vírus e a baixa de imunidade característica em mulheres gestantes e/ou portadoras do HIV

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

---

Trata-se de um estudo prospectivo de detecção do índice de prevalência dos vírus gastroentéricos (rotavírus, adenovírus, astrovírus e calicivírus) em mulheres grávidas ou não, soropositivas ou não para HIV, atendidas em consultas no serviço de ginecologia e obstetrícia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia (HC-UFG). O estudo foi realizado no período de 01 de julho de 2006 a 30 de junho de 2007, através da pesquisa destes vírus em amostras de fezes destas pacientes.

Durante este período foram atendidas 4040 mulheres nos ambulatórios de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG, das quais 84 participaram da pesquisa.

### **5.1 População estudada**

A população de estudo foi composta por mulheres que procuraram espontaneamente ou foram encaminhadas para consultas nos serviços selecionados, no período pré-fixado. De acordo com os critérios definidos para a inclusão e permanência no grupo, foram excluídas as portadoras de doenças gastrointestinais crônicas que poderiam evoluir com episódios diarréicos (doença de Chron, lúpus, síndrome do cólon irritável). Todas as participantes confirmaram suas anuências formais, de acordo com o instrumento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (Protocolo número 133/05).

### **5.2 Coleta de amostras fecais**

Um instrumento de coleta preparado para os fins deu origem ao banco de dados que concentra informação sobre a identificação das pacientes (idade,

história obstétrica anterior e da atual gestação), antecedentes de episódios de diarreia, carga viral para HIV e contagem de células CD4 e CD8 para as mulheres positivas para gastroenterovirose (Anexo pg 125).

Rigorous manual de procedimentos garantiu a adequação e a homogeneidade na coleta dos dados. A coleta das amostras fecais foi feita em recipientes específicos, no HC ou em suas residências, quando necessário, sendo imediatamente acondicionadas sob refrigeração (em caixas de isopor com gelo) e entregues no mesmo dia ao Laboratório de Virologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP), onde o material foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até à realização dos exames.

A coleta foi feita bimestral durante 12 meses, cobrindo possíveis variações sazonais de circulação viral. A coleta de rotina se repetiu com frequência diferenciada em caso de manifestação de processo diarreico.

### **5.3. Metodologia de identificação e caracterização genômica**

#### **5.3.1 Preparo das Suspensões Fecais**

As amostras fecais foram inicialmente processadas para a obtenção de uma suspensão a 20%, em tampão salina fosfato (PBS) pH 7.4. As suspensões foram então homogeneizadas e clarificadas por centrifugação a  $3000 \times g$  por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$

#### **5.3.2 Detecção de Rotavirus A**

As amostras foram analisadas visando a detecção de Rotavírus A por duas metodologias:

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA), seguindo a descrição de Pereira et al. (1983), com a coloração do gel feita pela prata, de acordo com Herring et al. (1982);

Ensaio Imunoenzimático (EIA) RIDASCREEN® Rotavírus, conforme instruções do fabricante (R-Biopharm)

### **5.3.2.1 - EGPA**

#### a) - Extração do dsRNA viral

As suspensões fecais das amostras coletadas, bem como a amostra protótipo de rotavírus de símio (SA-11) usada como padrão, foram incubadas com sulfato duodecil de sódio (SDS) a 10%. Em seguida, o dsRNA viral foi extraído com fenol/clorofórmio (volume/volume) e o sobrenadante foi então precipitado com etanol absoluto e NaCl a 20%, por no mínimo 18 horas, a - 20°C.

#### b) - Preparo das amostras para aplicação no gel de poliacrilamida

Após o período de no mínimo 18 horas, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 14.000g, para a total precipitação do dsRNA. O pellet (sedimento) resultante foi então re-suspendido em tampão de amostra incubado a 60°C por 30 minutos e aplicado em gel de poliacrilamida, em cuba de eletroforese vertical contendo tampão de corrida (Tris/glicina 1X). O sistema foi então submetido a uma corrente elétrica de 40 miliamperes (mA), por 3 a 4 horas. Após o término da corrida, o gel foi fixado em uma solução de etanol a 10% e ácido acético a 0,5%, e submetido à coloração pela solução de nitrato de prata a 0,01M e revelado por solução contendo NaOH 3% e formaldeído a 0,76%.

### **5.3.2.2 - EIE**

O ensaio RIDASCREEN® Rotavírus consiste de um método "sandwich" para a detecção de antígenos do grupo Rotavirus, onde os orifícios da microplaca são sensibilizados com anticorpos monoclonais contra a proteína VP6. Adicionou-se a suspensão fecal juntamente com outro anticorpo monoclonal anti-rotavírus, conjugado com a peroxidase. A reação é revelada

pela solução de substrato, composta pelo cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) e pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A reação é bloqueada pelo uso de 2M  $H_2SO_4$ . A leitura da reação é realizada em espectrofotômetro, com a utilização de filtro simples no comprimento de onda de 450 nm (Behring EL 311). O ponto de corte (cut-off) é definido como o valor da absorbância do controle negativo acrescentado-se 0,15 de unidade. As amostras são consideradas positivas para rotavírus quando apresentam densidade óptica (DO) maior que o valor do ponto de corte (respeitando uma margem de erro de 10%).

### **5.3.3 Detecção de Adenovírus**

O ensaio RIDASCREEN® Adenovírus consiste de um método "sandwich" para a detecção de antígenos para Adenovírus, onde os orifícios da microplaca são sensibilizados com anticorpos monoclonais contra o antígeno. Adicionou-se suspensão fecal juntamente com um anticorpo monoclonal anti-adenovírus, conjugado com a peroxidase. A reação é revelada pela solução de substrato, composta pelo cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) e pelo  $H_2O_2$ . A reação é bloqueada pelo uso de 2M  $H_2SO_4$  e a leitura sendo realizada em espectrofotômetro. O ponto de corte (cut-off) é definido por um valor acrescentado-se 0,15 de unidade de absorbância à medida da absorbância do controle negativo. As amostras são consideradas positivas para adenovírus quando apresentam densidade óptica (DO) maior que o valor do ponto de corte (respeitando uma margem de erro de 10%).

### **5.3.4 Detecção de Astrovírus**

#### **a) Extração do ssRNA viral**

O ssRNA viral foi extraído a partir de suspensões fecais a 20% de acordo com o método descrito por Boom et al., (1990) com modificações (Cardoso et al., 2002). Para o procedimento, em tubos tipo eppendorf foram adicionados

300  $\mu\text{L}$  da suspensão fecal, juntamente com 800  $\mu\text{L}$  de tampão L6 (isotiocianato de guanidina/TRIS-HCl 1 M Ph 6,4/EDTA 0,2 M pH 8,0/Triton-X 100) e 20  $\mu\text{L}$  de Proteinase K (10 mg/rnL) (Invitrogen®/Life Technologies). Procedeu-se a homogeneização por inversão e incubação em banho-maria a 56°C por 10 minutos. Após, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (Quimex) gelado e 15  $\mu\text{L}$  de sílica (Sigma-Aldrich®), quando então, se procedeu agitação em vórtex seguida de incubação sob agitação a temperatura ambiente por 15 minutos (agitador KLINE-EVLAB modelo EV:O7E). Depois, a amostra era centrifugada a 9.000 X g por 30 segundos, o sobrenadante era descartado e ao sedimento foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de tampão L2 (isotiocianato de guanidina/TRIS-HCl 1M pH 6,4), seguindo-se de centrifugação de 9.000 X g por 30 segundos. A seguir, o sobrenadante era novamente descartado e o sedimento submetido a uma etapa de lavagem com 500  $\mu\text{L}$  de etanol a 70% gelado e a uma lavagem com 500  $\mu\text{L}$  de acetona P.A. gelada. As lavagens foram seguidas de centrifugação nas mesmas condições anteriores. Após novo descarte do sobrenadante, o material precipitado era incubado em banho-maria a 56°C por 15 minutos para completa evaporação e então ressuspendido em 40  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q estéril tratada com DEPC (USB®/Corporation/Amersham Biosciences) a 0,1%. A amostra era então agitada em vórtex, incubada a 56°C por 15 minutos, sendo posteriormente, agitada novamente em vórtex e centrifugada a 9.000 X g por três minutos. O sobrenadante era então coletado e armazenado a - 20°C até o momento do uso.

#### b) Obtenção do cDNA (DNA complementar)

A transcrição reversa foi realizada em tubos tipo eppendorf, onde foram adicionados 16  $\mu\text{L}$  do RNA viral obtido na extração e 2  $\mu\text{L}$  do iniciador randômico pd(N)6 (Random Hexamer -Amersham Biosciences). Esta mistura era incubada a 80°C durante 10 minutos para a realização da desnaturação e, posteriormente, em banho de gelo por cinco minutos. A seguir, era adicionada a mistura de reação para a obtenção do cDNA, volume total de 50  $\mu\text{L}$ , contendo tampão 1X de reação: PCR buffer (TRIS-HCl 20 mM pH 8,4/KCl 50

mM), 0,4 mM de cada dNTP, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 U/μL de inibidor de RNase e 120 U/ μL da enzima transcriptase reversa MMLV. A amostra era então incubada em banho-maria a 42°C durante 60 minutos e o material armazenado a - 20°C até o uso.

#### c) Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A PCR foi realizada utilizando os iniciadores específicos Mon 269 e Mon 270 (Quadro 1) direcionados para a região RLA2 do genoma viral, conforme descrito por Noel et al., (1995).

**Quadro 1** - Sequência dos iniciadores utilizados para a PCR, para a detecção do material genômico de astrovírus.

INICIADOR	POLARIDADE	SEQUÊNCIA	POSIÇÃO GENÔMICA
Mon 269	Positiva	CAACTCAGGAAACAGGGTGT	4526-4545
Mon 270	Negativa	TCAGATGCATTGTCATTGGT	4955-4974

Para a realização da PCR eram utilizados 10 μL do cDNA obtido ao qual era adicionado em tubos tipo eppendorf, a mistura de PCR. Esta era composta pelos mesmos reagentes utilizados para obtenção do cDNA com exceção do inibidor de RNase e da transcriptase reversa que foram substituídos por 2,5 U/μL da enzima Taq DNA polimerase e pela utilização dos iniciadores específicos (0,4 μL Mon 269-270) e 1,2 mM de MgCl<sub>2</sub>. A seguir, a amostra era levada ao termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) para o procedimento da amplificação em 40 ciclos (94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por um minuto), seguindo-se de uma elongação final a 72°C por 10 minutos.

#### d) Eletroforese em gel de agarose

Após a amplificação, 20 μL do produto da PCR e o padrão de peso molecular 123 bp DNA ladder (Invitrogen™/Life Technologies), eram misturados a 1 μL do tampão corante da amostra (azul de bromofenol, xilenocianol, glicerol) e aplicados em gel de agarose (Invitrogen™/Life Technologies) a 1,5% contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídeo e, submetido a uma corrente elétrica de 80 volts por 30 a 40 minutos em tampão 1X

TRIS/Borato/EDTA (TBE). Em todas as reações foram utilizados controles com amostras reconhecidamente positivas para astrovírus e como controle negativo utilizou-se água Milli-Q estéril. Procedida a eletroforese, o gel era examinado em transluminador (Macro Vue UV-20 – Hoefer Scientific Instruments) com luz ultravioleta para observação do produto esperado de 449 pares de bases.

Todas as etapas da reação foram executadas em ambientes separados e assépticos, com a finalidade de evitar a contaminação.

### 5.3.5 Genotipagem de Astrovírus Humanos (HAstVs)

As amostras positivas para astrovírus foram submetidas à genotipagem empregando a metodologia de *Nested/RT-PCR*, utilizando iniciadores direcionados para a região *ORF2* do genoma viral, conforme descrito por Sakamoto et al., (2000) com modificações.

#### **a) Reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR)**

Inicialmente, cada amostra positiva foi submetida a uma nova extração para a obtenção do *ssRNA* viral. Após, procedia-se a realização da transcrição reversa, onde em tubo tipo *ependorf*, era adicionado 1,4 µL do par de iniciadores PreCAP1 e 12Gr (33 µM de cada) (Quadro 02) e 8 µL do RNA viral obtido na extração, e então esta mistura era incubada a 95°C durante 5 minutos para a desnaturação, e posteriormente, em banho de gelo por 5 minutos. A seguir, era adicionada a mistura de reação para obtenção do *cDNA* em um volume final de 25 µL, contendo 0,2 mM de cada dNTP, tampão de reação 1X (*PCR buffer* – 20 mM de TRIS/HCl pH 8,4 – KCl 50 mM), gelatina a 0,01%, 2 mM de DTT (dithiothreitol), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 U/µL da enzima transcriptase reversa *SuperScript™ II* (Invitrogen™ / Life Technologies) e 12 U/µL do inibidor de ribonuclease *RNaseOUT™ Recombinant* (Invitrogen™ / Life Technologies). A amostra era, então, incubada em banho-maria a 42°C durante 60 minutos e, após esta incubação, era submetida à primeira amplificação do DNA pela *PCR*.

Para a realização desta etapa, era adicionado ao mesmo tubo tipo *ependorf* empregado para a obtenção do *cDNA*, uma mistura de *PCR* para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . Esta era composta pelos mesmos reagentes e condições de concentração empregados na etapa anterior, com exceção da não utilização do par de iniciadores PreCAP1 e 12Gr, gelatina, transcriptase reversa e inibidor de ribonuclease e pela utilização de 1,5 U/ $\mu\text{L}$  da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™ / Life Technologies). A seguir, a amostra era levada ao termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal) para a primeira amplificação por *PCR* em 40 ciclos (94°C por um minuto para desnaturação; 45°C por dois minutos para anelamento; 72°C por três minutos para extensão), seguindo-se de um ciclo de extensão final a 72°C durante 7 minutos.

**Quadro 2** - Sequência dos iniciadores utilizados na *RT-PCR* para a genotipagem de astrovírus humanos.

Iniciador	Polaridade	Sequência	Posição Genômica
PreCAP1	Positiva	GGACTGCAAAGCAGCTTCGTG	-82 – 62
12Gr	Negativa	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGC	2454-2473

#### **b) Segunda etapa de amplificação do DNA - NESTED-PCR**

Após a realização da *RT-PCR*, os produtos obtidos de cada amostra eram, então, submetidos a uma nova etapa de amplificação, a *nested-PCR*. Para a realização desta etapa, foram adicionados em tubos tipo *ependorf*, 2,5  $\mu\text{L}$  do produto obtido na *RT-PCR* e 2  $\mu\text{L}$  da mistura dos iniciadores END e *pool* genotipo-específicos AST-S1 – AST-S8 (33  $\mu\text{M}$  de cada) (Quadro 3). A seguir, foi adicionada uma mistura de reação de *Nested-PCR* para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , contendo os mesmos reagentes e condições de concentração empregados na primeira etapa de amplificação do DNA pela *PCR*, com exceção para o  $\text{MgCl}_2$  (1,4 mM). As condições para a realização da amplificação foram semelhantes às empregadas na primeira amplificação do DNA.

**Quadro 3** - Sequência dos iniciadores utilizados na *nested-PCR* para a genotipagem de astrovírus humanos.

Iniciador	Polaridade	Sequência	Posição Genômica
AST-S1	Positiva	AACCAAGGAATGACAATGAC	2166-2185
AST-S2	Positiva	ACCTGCGCTGAGAACTG	2247-2264
AST-S3	Positiva	CTGCTTGCATCTGGTCTTTCA	2283-2303
AST-S4	Positiva	TGATGATGAAGACTCTAATAC	2071-2091
AST-S5	Positiva	TAGTAACTTATGATAGCC	2014-2031
AST-S6	Positiva	TGGCCACCCTTGTTCCCTCAGA	1951-1971
AST-S7	Positiva	CTAGACAACAACACCCCG	1842-1859
AST-S8	Positiva	GGTAAGTGGTACCTGCTAACTAG	1753-1775
END	Negativa	TCCTACTCGGCGTGGCCGC	2377-2359

### **c) Eletroforese em gel de agarose**

Após a realização da segunda etapa de amplificação do DNA, 10  $\mu\text{L}$  do produto obtido de cada amostra, juntamente com os padrões moleculares 50 *bp DNA ladder* e 100 *bp DNA ladder* (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de cada), além dos controles positivo (HAstV-1) e negativo (Água MilliQ), eram misturados a 1  $\mu\text{L}$  do tampão corante da amostra (azul de bromofenol, xilenocianol, glicerol) e aplicados em gel de agarose a 2% contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídeo e, submetido a uma eletroforese de 80 volts durante 60 minutos em tampão TRIS/Borato/EDTA (TBE) 1X. Procedendo-se a eletroforese, o gel era examinado em transluminador com luz ultravioleta para observação do *amplicon* correspondente a cada genotipo de astrovírus: HAstV-1 (212 pb), HAstV-2 (158 pb), HAstV-3 (119 pb), HAstV-4 (258 pb), HAstV-5 (388 pb), HAstV-6 (427 pb), HAstV-7 (548 pb) e HAstV-8 (599 pb).

### 5.3.6 Detecção de Calicivírus

A detecção de calicivírus foi realizada por RT-PCR, fazendo-se a extração do RNA viral, a partir de soluções fecais a 20% pelo método da sílica, utilizando o isotiocianato de guanidina, como descrito por Boom et al., (1990), modificado por Cardoso et al., (2002), conforme já especificado para astrovírus.

#### 5.4.6.1 - Obtenção do cDna

a) - A transcrição reversa foi realizada utilizando-se o iniciador randômico pd(N)<sub>6</sub> (Random Hexamer – Amersham Biosciences) e a PCR utilizando-se os iniciadores E3/NI e 289/290 descritos por Green et al., (1995) e Jiang et al., (1999), respectivamente.

b) - Para o procedimento, um volume de 20µL de RNA foi acrescido de 2µL do iniciador randômico pd(N)<sub>6</sub> (Amersham Biosciences). A desnaturação era feita a 80°C por 10 minutos e, após, era adicionada mistura de reação para um volume final de 50 µL [0,4 mM de cada dNTP (Amersham Biosciences), 1x tampão de reação (Invitrogen), 4 Mm MgCl<sub>2</sub>, 20 U/µL de inibidor de RNase (Invitrogen), 200 U/µL transcriptase reversa MMLV (USB)]. A reação era processada a 42°C por 60 minutos em banho-maria.

c) - Reação em cadeia pela polimerase (PCR): Eram utilizados, para a reação de amplificação, 10 µL do cDNA empregando dois conjuntos de iniciadores específicos: E3/NI (Green et al., 1995), que detecta norovírus GI e GII, e 289/290, que detecta norovírus e sapovírus (Jiang et al., 1999) (Quadro 4). A reação foi feita em um volume final de 50 µL, utilizando-se os reagentes nas mesmas concentrações como da reação para obtenção do cDNA, com exceção de 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5U/ µL Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 0,4 µM de cada iniciador. A ciclagem era realizada nas seguintes condições: 35 ciclos: 15 segundos/95°C-45 segundos/40°C, um minuto/72°C e uma extensão final de cinco minutos/72°C. O produto da reação era então submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo (0,5 µL g/mL).

Em todas as reações, eram utilizadas como controle positivo de reação amostras positivas para calicivírus cedidas pelo Laboratório de Virologia Comparada da FIOCRUZ, e, como controle negativo, água Milli Q estéril. Todas as etapas da reação foram executadas em ambientes separados e assépticos, com a finalidade de não permitir contaminação.

Os produtos de amplificação eram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador ultra violeta sendo comparado com o padrão de peso molecular, DNA Ladder 100 pb (Amersham Biosciences). O quadro 4 mostra o tamanho esperado do fragmento amplificado considerando o par de iniciador utilizado.

**Quadro 4** - Iniciadores específicos utilizados no ensaio de RT -PCR, para a detecção de calicivírus e tamanho esperado do produto amplificado

INICIADOR	SEQUÊNCIA DE DNA (5'-3')	LOCALIZAÇÃO GENÔMICA	PRODUTO AMPLIFICADO
E3	ATCTCATCATCACCATA	4865-4881 (-)	113 pb
NI	GAATTCCATCGCCCACTGGCT	4768-4788 (+)	113 pb
289	TGACAATGTAATCATCACCATA	4865-4886 (-)	319 (norovírus) ou
290	GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	4568-4590 (+)	331 pb (sapovírus)

## 5.4 Análise do tamanho da amostra

Pelo teste de amostragem com o  $p = 0,24$ ; nível de significância de 5% e com erro de 9% o tamanho da amostra necessária para o estudo foi estimado em 84 mulheres.

## 5.5 Análise estatística

Para a análise da possível associação entre a presença de gastroenterovírus, a gravidez e/ou o HIV, utilizou-se o teste exato de Fisher com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

---

## **6. RESULTADOS**

Foram examinadas 314 amostras fecais de 84 mulheres atendidas no serviço de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG, no período compreendido entre 01 de julho de 2006 a 30 de junho de 2007. Elas foram distribuídas para análise em quatro grupos caracterizados como de mulheres soropositivas para identificação do HIV (gestantes e não gestantes) e mulheres sem a infecção pelo HIV (gestantes e não gestantes), como se vê na Tabela 1.

A coleta do material para exame foi feita em intervalos bimestrais, com previsão de até cinco amostras individuais.

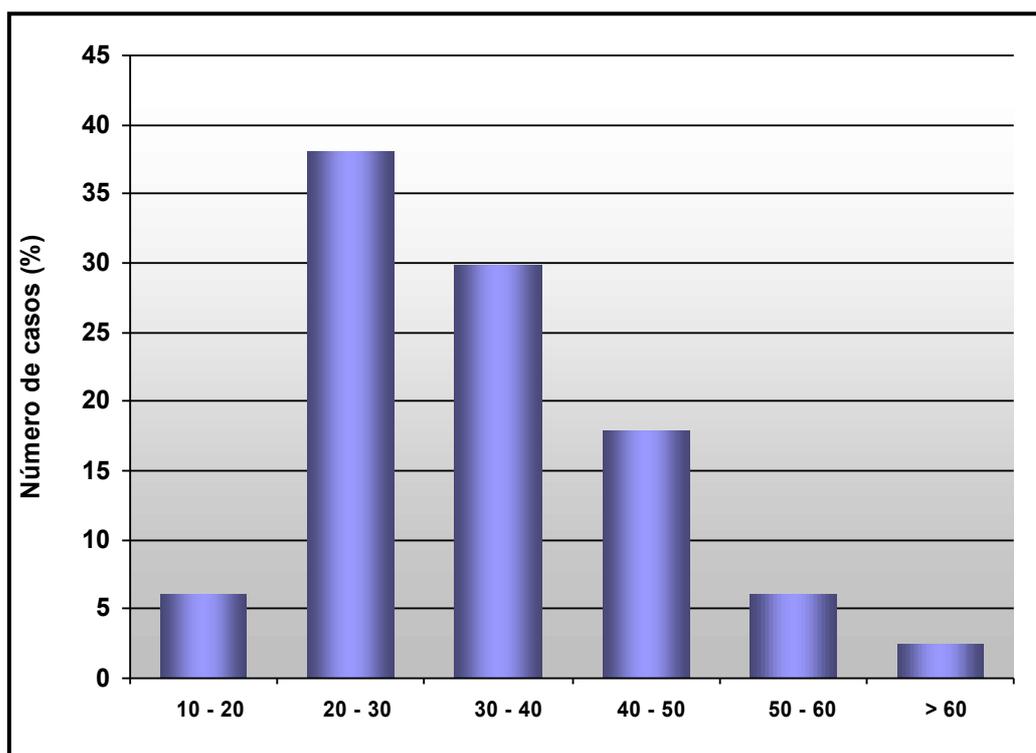
**Tabela 1** – Distribuição das mulheres examinadas no serviço de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG, de julho de 2006 a junho de 2007, segundo os grupos amostrais

HIV	Gestantes		Não gestantes		Total	
	n	%	N	%	n	%
Positivo	19	42,22	10	25,64	29	34,52
Negativo	26	57,78	29	74,36	55	65,48
Total	45	100,00	39	100,00	84	100,00

**P = 0,053**

Não houve diferença significativa entre os grupos de mulheres positivas para o HIV e HIV negativas quanto a estar ou não estar gestante, isto é, os grupos (HIV positivo e HIV negativo) foram homogêneos ( $p = 0,053$ ).

A distribuição das mulheres por faixa etária (Figura 1) mostra que 43,7% das mulheres tinham idade  $\leq$  a 30 anos, das quais cinco (7,8%) ainda adolescentes, ou seja, tinham até dezenove anos de idade; 32,8% se incluíam na faixa entre 30 e 40 anos e 23,5% tinham mais de 40 anos.



**Figura 1** - Distribuição das mulheres examinadas no serviço de ginecologia e obstetria do HC-UFG, de julho de 2006 a junho de 2007, segundo à faixa etária

Em 19 (22,6%) das 84 mulheres estudadas, foi encontrado algum vírus gastroentérico e das 314 amostras fecais coletadas 33 (10,5%) foram positivas. Considerando o tipo de vírus detectado, 14 (16,6%) mulheres, foram positivas para calicivírus, 6 (7,1%) para astrovírus e nenhuma para rotavírus ou adenovírus. Uma mulher apresentou infecção para calicivírus e astrovírus em amostras fecais distintas (Tabela 2).

**Tabela 2** - Distribuição dos vírus gastroentéricos encontrados em 84 mulheres estudadas no serviço de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG, de junho de 2006 a julho de 2007 e proporção de amostras fecais coletadas positivas

Vírus gastroentéricos	n.Positivas/n.examinadas			
	Mulheres (N= 84)		Amostras fecais (N=314)	
	n.	%	n.	%
Calicivírus	14	16,7	27	8,6
Astrovírus	6	7,1	6	1,9
Rotavirus	-	0,0	-	0,0
Adenovirus	-	-	-	0,0
Total	19*	22,6	33	10,5

\* Uma mulher foi positiva para calivírus e astrovírus

A Tabela 3 mostra que, das 29 mulheres soropositivas para HIV, sete (24,1%) eram positivas também para os vírus gastroentéricos, enquanto que das 55 soronegativas, doze mulheres (21,8%) eram positivas para os vírus gastroentéricos. A análise estatística dos dados mostrou que não houve diferença significativa entre a presença dos vírus gastroentéricos e as mulheres serem portadoras ou não do HIV ( $p = 0,207$ ).

**Tabela 3** - Distribuição das mulheres positivas para os vírus gastroentéricos segundo a presença ou não do HIV, atendidas no serviço de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG, de julho de 2006 a junho de 2007

Presença de HIV	Mulheres com vírus gastroentéricos				Total	
	Sim		Não		N	%
	n	%	N	%		
Sim	07	24,1	22	75,9	29	100,00
Não	12	21,8	43	78,2	55	100,00
Total	19	22,6	65	77,4	84	100,00

**$p=0,207$**

A Tabela 4 mostra que, das sete mulheres gestantes e positivas para os vírus gastroentéricos, 6 (13,3%) eram soropositivas para o HIV, enquanto que das mulheres não gestantes positivas para os vírus gastroentéricos, seis eram

positivas e seis eram negativas para o HIV. A análise estatística mostra que neste grupo de mulheres não foi significativa a diferença entre a mulher portadora dos vírus gastroentéricos ser ou não ser gestante ou portadora do HIV ( $p=0,128$ ).

**Tabela 4** - Distribuição das mulheres portadoras de vírus gastroentéricos segundo o estado gestacional e a infecção pelo HIV, atendidas no serviço de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG, de julho de 2006 a junho de 2007

Presença de HIV	Gestantes (n-45)		Não gestantes (n-39)		Total	
	n.	%	n.	%	n.	%
Positivo	06	13,3	06	15,4	12	14,3
Negativo	01	2,2	06	15,4	07	8,3
Total	07	15,5	12	30,8	19	22,6

**p = 0,128**

No Quadro 5 observa-se que das 19 pacientes positivas para os vírus gastroentéricos, três (15,8%) apresentaram diarreias freqüentes, sendo uma gestante com HIV e duas gestantes sem HIV. Das 65 negativas, quatro (6,2%) tiveram diarreias eventuais, (três com o vírus HIV, sendo duas gestantes, uma não gestante e outra negativa para o vírus HIV e não gestante). Entretanto, quando se analisou os dados relativos à carga viral nas sete mulheres positivas para o HIV e também positivas para os vírus gastroentéricos, percebeu-se que em cinco delas (71,4%) a carga viral era indetectável (<50 cópias por célula) por ocasião da primeira coleta da amostra fecal. Quando se analisou os dados relativos à imunidade celular nas 19 mulheres com amostras positivas para os vírus gastroentéricos, percebeu-se que os valores de linfócitos TCD4 estiveram abaixo de 250 células/mm<sup>3</sup> em cinco delas (26,3%).

**Quadro 5** - Distribuição das mulheres positivas para os vírus gastroentéricos segundo a presença de diarreia, carga viral e dosagem de TCD4, atendidas no serviço de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG, de julho de 2006 a junho de 2007

Diarréia*	Presente: 3/19 (15,8%)	Ausente: 16/19 (84,2%)
Carga viral	Detectável: 2/7 (28,6%)	Indetectável: 5/7 (71,4%)

TCD4	Maior 250: 14/19 (73,7%)	Menor 250: 5/19 (26,3%)
* Diarréia nas mulheres negativas para os vírus gastroentéricos:		
	Presente: 4/65 (6,2%)	ausente: 61/65 (93,8%)

Os resultados da Tabela 5 mostram que a gestação, na presença ou não de positividade para o HIV como fator redutor da capacidade imunológica (seis e sete casos, respectivamente), esteve associada à presença de vírus gastroentéricos em 68,4% (13 das 19) das mulheres infectadas pelos vírus estudados, embora não tenha observado diferença estatística significativa com o grupo de mulheres também positivas para os vírus gastroentéricos e que eram soronegativas para o HIV e não gestantes ( $p = 0,199$ ).

**Tabela 5** - Distribuição das mulheres segundo sua condição imunológica (gestante e/ou portadora de HIV) e a presença de vírus gastroentéricos, atendidas no serviço de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG, de julho de 2006 a junho de 2007

Gesta/ HIV	Vírus gastroentéricos				Total	
	Sim		Não		n	%
	n	%	n	%		
Sim	13	68,42	41	63,08	54	64,29
Não	6	31,58	24	36,92	30	35,71
Total	19	100,00	65	100,00	84	100,00

**$p = 0,199$**

Considerando o tipo viral detectado em relação às condições de infecção por HIV e estado gestacional foi observado que das 14 mulheres positivas para calicivírus, quatro (28,6%) eram soropositivas para HIV e destas, três eram gestantes (Tabela 6), enquanto que das seis mulheres positivas para o astrovírus, 5 (83,3%) eram gestantes e destas três eram soropositivas para o HIV (Tabela 7).

**Tabela 6** - Distribuição das mulheres portadoras de calicivírus segundo o estado gestacional e a contaminação pelo HIV, atendidas no serviço de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG, de julho de 2006 a junho de 2007

HIV	N.Positivas (n=14)			
	Gestantes		Não gestantes	
	n.	%	n.	%
Positivo	03	21,4	01	7,1
Negativo	05	35,7	05	35,7

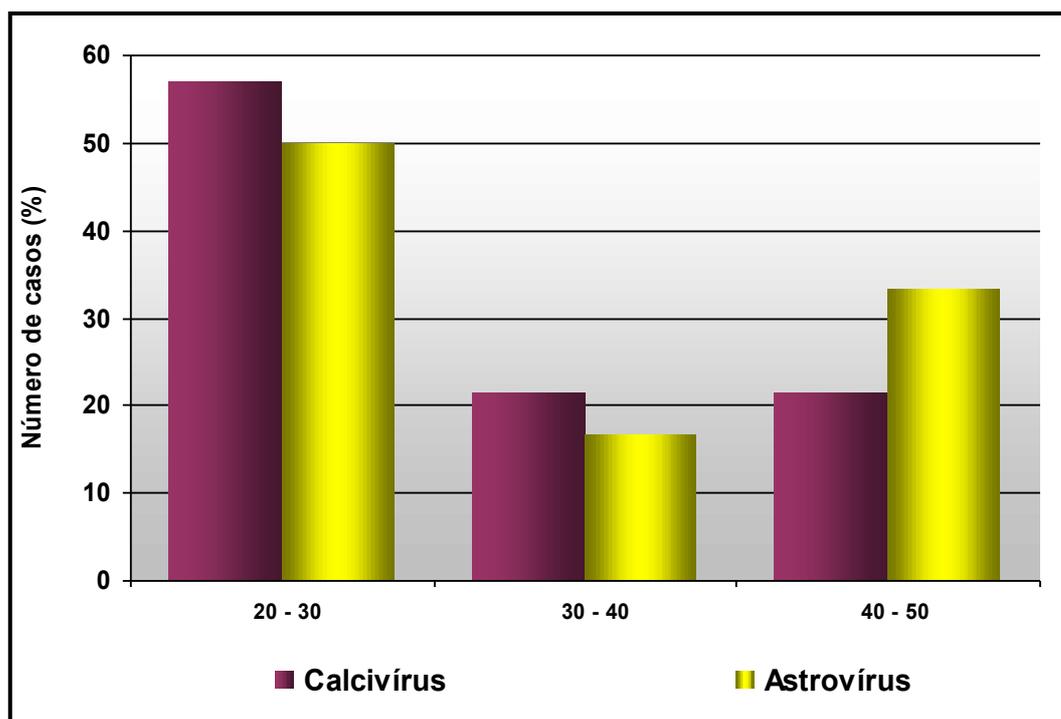
**p = 0,336**

**Tabela 7** - Distribuição das mulheres portadoras de astrovírus segundo o estado gestacional e a positividade para o HIV, atendidas no serviço de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG, de julho de 2006 a junho de 2007

HIV	N.Positivas (n= 6)			
	Gestantes		Não gestantes	
	n.	%	n.	%
Positivo	03	50,0	-	0,0
Negativo	02	33,3	01	16,7

**p = 0,500**

As mulheres positivas para os vírus gastroentéricos (19) estavam predominantemente entre as faixas etárias de 20 a 30 e 40 a 50 anos (Figura 2). Nenhuma das adolescentes apresentou infecção viral por vírus gastroentérico.



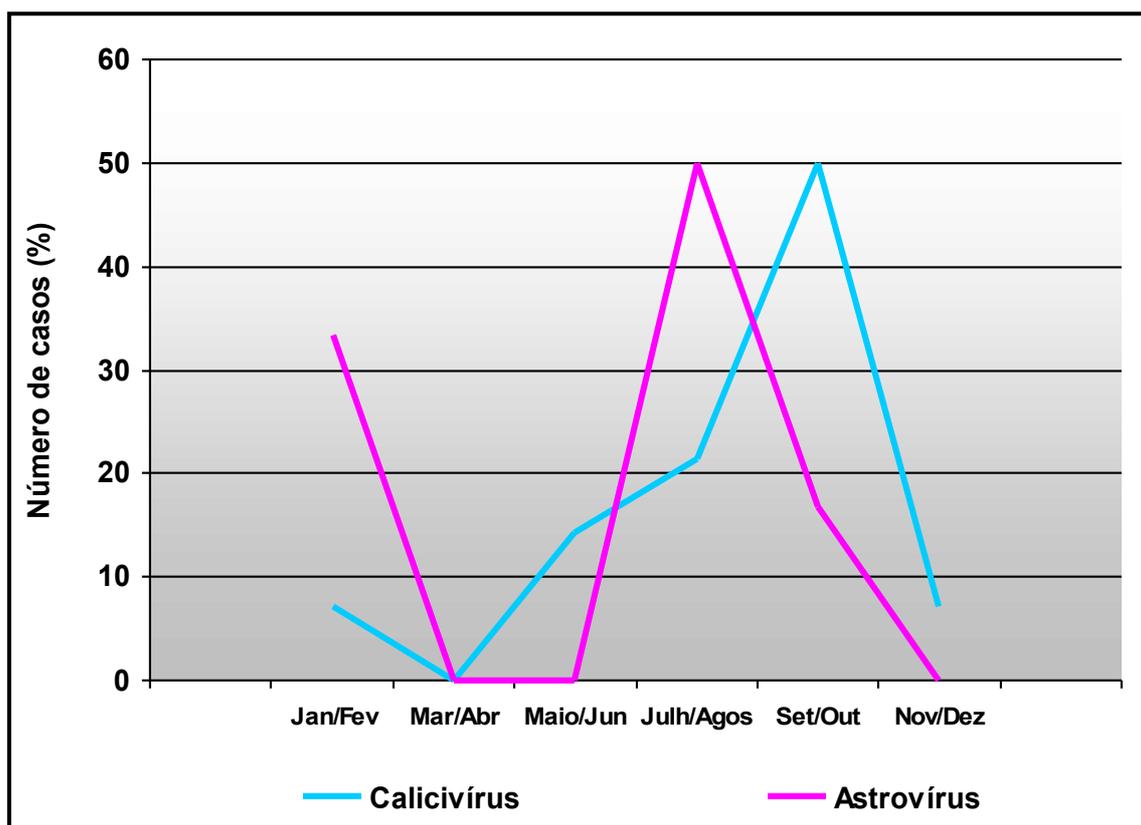
**Figura 2** - Distribuição das mulheres portadoras de vírus gastroentéricos segundo a faixa etária, atendidas no serviço de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG, de julho de 2006 a junho de 2007

Das 19 mulheres positivas para gastroenterovírus, 13 tiveram uma única amostra positiva e seis tiveram mais de uma amostra positiva coletada em momentos diferentes do processo, como se vê na Tabela 8. Uma destas mulheres teve três amostras fecais positivas que foram coletadas com intervalo de dois meses e uma outra foi positiva em duas amostras, porém com intervalo de seis meses de coleta.

**Tabela 8** – Distribuição da presença de vírus gastroentéricos nas diferentes amostras de fezes colhidas em cada mulher, atendidas no serviço de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG, de julho de 2006 a junho de 2007

Amostra	Presença de vírus gastroentéricos				Total	
	Calicivirus		Astrovirus		n	%
	n	%	n	%		
Primeira	01	7,1	04	66,7	05	25,0
Segunda	03	21,4	00	0,0	03	15,0
Terceira	01	7,1	02	33,3	03	15,0
Quarta	02	14,3	00	0,0	02	10,0
Quinta	01	7,1	00	0,0	01	05,0
Primeira e segunda	01	7,1	00	0,0	01	05,0
Primeira e terceira	02	14,3	00	0,0	02	10,0
Segunda e quinta	02	14,3	00	0,0	02	10,0
Primeira/segunda/terceira	01	7,1	00	0,0	01	05,0
Total	14	100,0	06	100,0	20	100,0

O padrão de circulação dos calicivírus e astrovírus durante o período de estudo, pode ser visto na Figura 3, que mostra maior índice de detecção de astrovírus nos meses de junho e agosto e de calicivírus nos meses de setembro e outubro.



**Figura 3** - Distribuição de frequência dos gastroenterovírus nas mulheres atendidas no serviço de ginecologia e obstetrícia do HC-UFG, de julho de 2006 a junho de 2007

A genotipagem das 6 amostras de astrovírus mostrou predominância do genótipo 1, encontrado em quatro amostras, detecção do genótipo 3 em uma amostra e do genótipo 8 em outra amostra.

## 7. DISCUSSÃO

Os vírus gastroentericos não tem sido objeto de preocupação durante a assistência ao pré-natal. A ocorrência relatada neste estudo e o papel da mãe como veículo transmissor do vírus, sugere ações de orientações preventiva neste período e ainda nos motiva a incentivar as pesquisas científicas na busca de vacinas efetivas para este grupo de vírus

As informações disponíveis na literatura não foram suficientes para responder às muitas inquietações advindas da história natural dos gastroenterovírus na população adulta. Não se dispõe de dados desta natureza, especificamente analisados em relação a mulheres gestantes e a possíveis associações entre a infecção e o desenvolvimento do feto ou do recém-nascido.

Esta proposta de trabalho se caracterizou, portanto, como uma primeira aproximação em relação ao problema, agrupando, para os fins, vírus gastroentéricos de apresentação mais freqüente na clínica médica e que apresentam características epidemiológicas similares (rotavírus, adenovírus entérico, astrovírus e calicivírus (Hutson et al., 2003).

No presente estudo os vírus gastroentéricos estiveram presentes em 22,6% das mulheres avaliadas, representados pelos calicivírus e astrovírus. Dados da literatura apontam a ocorrência desses vírus no Brasil em percentuais que variam entre 12 e 47% de crianças com gastroenterite, atendidas em ambulatórios ou hospitais (Linhares, 2000; Kapikian et al., 2001, Cardoso et al., 2003). No entanto, dados sobre a prevalência destes agentes na população adulta são escassos. A infecção se dá, preferencialmente, na infância, considerando-se os altos índices de infecção prévia pelos diversos tipos de vírus gastroentéricos entre as crianças com mais de três anos de idade (Wilhelmi et al., 2003; Okitsu-Negishi et al., 2004).

Tais considerações feitas inicialmente passaram a exigir maior atenção e mais conhecimento da história natural das gastroenteroviroses e do desenho epidemiológico de sua manifestação regional.

Nos países em desenvolvimento os vírus gastroentéricos são os principais responsáveis pela gastroenterite infantil aguda, principalmente os rotavírus e os

adenovírus (Kapikian et al., 2001). Entretanto, nas mulheres adultas estudadas no presente estudo foi encontrado astrovírus e calicivírus, não tendo sido detectado a presença de rotavírus ou adenovírus. Adicionalmente não foi encontrado gastroenterovírus nas adolescentes estudadas. As razões deste perfil epidemiológico expresso neste estudo não foram elucidadas, porém impõem

a necessidade de análises dirigidas posteriores.

Em relação à faixa etária predominante de 20 a 30 anos seguida de 40 a 50 anos nas portadoras de calicivírus e astrovírus avaliadas neste estudo, necessita-se de uma maior casuística para compreender esta distribuição, porém nesta população adulta estudada a presença destes vírus atingiu índices descritos em populações de crianças (Kapikian et al., 2001; Cardoso et al., 2003). Interferem nesta distribuição as várias exposições dos indivíduos aos vírus durante toda a vida, ao aumento da variabilidade genética viral, além de fatores de resistência do hospedeiro. Admite-se que os anticorpos adquiridos nos primeiros anos de vida confirmam proteção contra a enfermidade ocasionada pelos astrovírus até a fase adulta, porém tende a diminuir em pessoas com idade mais avançada (Matsui & Greenberg, 2001). Podendo interferir na circulação destes vírus em relação à faixa etária.

O padrão de circulação dos calicivírus e astrovírus durante o período de estudo, coincide com o período de maior circulação destes vírus no nosso meio e abre espaço para o levantamento de hipóteses explicativas para a frequência da distribuição dos episódios cíclicos destes gastroenterovírus na nossa região. Fenômeno de origem multifatorial, sua manifestação pode estar relacionada com as condições ambientais e com as condições imunológicas diferenciadas na mulher, o que ocorre durante o processo de gestação (Pereira et al., 2005).

Estudos sobre a transmissão vertical do citomegalovirus (Ferreira et al., 2005), e do HIV (Chou et al., 2005a) têm mostrado que o desequilíbrio imunológico facilita a infecção, re-infecção ou o surgimento de manifestações clínicas relacionadas com os processos virais (Treviio et al., 2001; Sebire et al., 2004).

O foco em ações de saúde coletiva e em medidas preventivas (ainda quando não se dispõe de medidas curativas) colocou em evidência as

mulheres gestantes (portadoras ou não do HIV), uma vez que se considera o período gestacional como de maior vulnerabilidade imunológica.

A inclusão de mulheres portadoras de HIV neste estudo justificou-se por considerar a presença de infecção por estes vírus, como um fator de diminuição da imunidade e conseqüente maior predisposição para as manifestações dos vírus gastroentéricos. Embora, os resultados deste estudo tenham mostrado uma associação entre a gestação, acrescida da presença do HIV e dos vírus gastroentéricos (68,4%), tendência ainda maior em relação ao astrovírus, não houve diferença estatisticamente significativa entre o comportamento dos dois grupos. O comprometimento imunológico das mulheres portadoras do HIV pode ter sido amenizado pela terapêutica antiretroviral e pelo seguimento clínico, considerando que mais de dois terços delas estavam com carga viral indetectável e CD4 superior a 250 células/mm<sup>3</sup>.

As amostras de fezes foram colhidas em intervalo bimestral (até cinco amostras para cada mulher), buscando a identificação dos vírus em qualquer uma das amostras. Esta apresentação viral variou entre as diferentes amostras de uma mesma mulher. Algumas mulheres apresentaram positividade para os mesmos grupos de vírus gastroentéricos em momentos diferentes do processo. Apenas uma mulher apresentou infecção pelos dois vírus diferentes, em momentos diferentes. Considerando que os vírus gastroentéricos são excretados pelas fezes em até duas semanas nos pacientes imunocompetentes e pode ser necessário um período de até oito semanas para restauração da função epitelial intestinal (Cichocki et al., 2008), procura-se entender tal distribuição de positividade. O mecanismo imunológico desenvolvido pela mulher durante a gravidez, específico para garantir a tolerância ao feto, diminui as subpopulações dos linfócitos B-1, responsáveis pela produção de auto-anticorpos poli reativos e pela regulação imunológica. Esta imunossupressão sistêmica durante a gestação pode contribuir para maior susceptibilidade a infecções ou reativações de processos virais e melhora de doenças auto-imunes (Clark, 1992).

Em assim sendo consideramos que esta repetição de positividade em momentos diferentes em períodos de até seis meses pode ser por reinfecção por um sorotipo distinto do vírus ou persistência da excreção viral fecal do mesmo sorotipo. A genotipagem das amostras positivas para o calicivírus

poderia auxiliar nesta elucidação, entretanto não foi possível realizá-la pela baixa quantidade do genoma viral amplificado destas amostras.

Os astrovírus foram detectados em apenas uma amostra de fezes, denotando, nestas mulheres avaliadas, que este vírus não apresentou durante este período, reinfecção ou persistência de excreção viral.

A caracterização genômica dos astrovírus encontrados expressando a predominância do genótipo 1 coincide com a literatura que cita os sorotipos 1 e 2 como os mais expressivos (De Grazia et al., 2004). Cardoso et al., em 2002 ao constatarem 2,8% de astrovírus em crianças com diarreia em Goiânia - GO, observaram que os vírus encontrados pertenciam ao sorotipo 1. Andreasi et al., em 2008 relataram 10 amostras fecais positivas para astrovirus em crianças de Campo Grande (MS), das quais, 60% pertenciam ao sorotipo 1, 30% ao sorotipo 2 e 10% ao sorotipo 4. Ressalta-se que ainda circulou entre as mulheres avaliadas no presente estudo os sorotipos 3 e 8.

O acompanhamento clínico das mulheres estudadas durante o período de um ano não revelou peculiaridades clínicas relevantes entre o grupo das positivas para os vírus gastroentéricos e as negativas. Porém houve maior frequência e intensidade de diarreias nas portadoras destes vírus, 15,8% e 6,2%, respectivamente.

Assumindo-se a presença da mãe nos cuidados das crianças como uma constante, recomenda-se atenção à presença dos vírus gastroentéricos nas gestantes, favorecendo oportunidade para tratamento e prevenção da transmissão de mãe para filho, durante os cuidados diários realizados.

A presença dos vírus gastroentéricos em mulheres gestantes deve ser considerada sob a ótica da sua própria vulnerabilidade imunológica advinda do processo gestacional, da possibilidade de transmissão vertical daqueles vírus e da conhecida via de transmissão orofecal. Portanto, abre espaço para medidas preventivas, uma vez que ainda não há vacina (exceto, para rotavírus) nem tratamento específico para as patologias advindas de tais infecções e da importância epidemiológica destes vírus como causa de morbimortalidade neonatal e infantil.

## **8. CONCLUSÕES**

---

1. Os vírus gastroentéricos estiveram presentes numa parcela relevante (22,6%) desta população de mulheres adultas estudadas, representados pelos calicivírus (16,7%) e astrovírus (7,1%). Não foram encontrados rotavírus e adenovírus.

2. Nas condições do presente estudo, não houve associação entre a gestação acrescida ou não da presença do HIV como fator redutor da capacidade imunológica e à presença dos vírus gastroentéricos; ou seja, o estado gravídico e/ou ser portadora do HIV não aumentou a chance destas mulheres serem portadoras dos vírus gastroentéricos.

## **9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

Abad FX, Pinto RM, Villena C, Gajardo R, Bosch A, 1997. Astrovirus survival in drinking water. *Appl Environ Microbiol*, 63: 3119-3122.

Abarca KV, Le Core NP, Perret CP, Wietstruck AP, Oddó DB, Barriga FC, 2008. Infección diseminada por adenovirus de curso fatal en un niño inmunocomprometido. *Rev chil infectol*, 25(2):127-132.

Adler JL, Zickl R, 1969. Winter vomiting disease. *J Infect Dis*, 119: 668-673.

Agus SG, Dolin R, Wyatt RG, Tousimis AJ, Northrup RS, 1973. Acute infections nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. *Ann Inter Med*, 79: 18-25.

Albert MJ, 1986. Enteric adenoviruses (Brief review). *Arch Virol*, 8:1-7.

Allard A, Albinsson B, Wadell G, 1992. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrheas by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol*, 37: 149-157.

[Anderson EJ](#), [Weber SG](#), 2004. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis*, 2:1-9.

Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC, Glass RI, 1995. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses). *J Clin Microbiol*, 38: 64-71.

[Andreas MSA](#), [Batista SMF](#), [Tozetti IA](#), [Ozaki CO](#), [Nogueira MM](#), [Borges AMT](#), [Fiaccadori FS](#), [Santos RAT](#), [Cardoso DDP](#), 2007. Rotavirus A among hospitalized infants, up to three years of age, with acute gastroenteritis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 40(4):411-414.

[Andreas MS](#), [Cardoso DDP](#), [Fernandes SM](#), [Tozetti IA](#), [Borges AM](#), [Fiaccadori FS](#), [Santos RA](#), [Souza M](#), 2008. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(7):741-744

Appleton H, Higgins PG, 1975. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet*, 1: 1297.

Atmar RL, Opekun AR, Gligler MA, Estes MK, Crawford SE, Neil FH, Graham DY, 2008. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Diseases*, 14: 10-13.

Araujo IT, Ferreira MSR, Fialho AM, Assis Rm, Cruz CM, Rocha M, Leite JPG, 2001. Rotavirus genotypes P(4)G9, P(6)G9 and P(8)G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol**, 39:1999-2001.

Baron RC, Greenberg HB, Cukor G, Blacklow NR, 1984. Serological responses among teenagers after natural exposure to Norwalk virus. **J Infect Dis**, 150 (4): 531-534.

Bass DM, Qiu S, 2000. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. **J Virol**, 76: 1810-1814.

Basu G, Rossouw J, Sebunya BA, Gashe M, De Beer M, Dewar ffi, Steele AD, 2003. Prevalence of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection in young children with gastroenteritis in Gaborone, Botswana. **East Afr Med**, 180: 652-655.

Becker KM, Moe CL, Southwick KL, Maccormack JN, 2000. Transmission of Norwalk virus during a football game. **N Engl J Med**, 343: 1223-7.

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

Belliot G, Laveran H, Monroe SS, 1997c. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. **J Med Virol**, 51: 101-106.

Belliot G, Fankhauser RL, Monroe SS, 2001. Characterization of "Norwalk-like viruses" and astroviruses by liquid hybridization **J Virol Methods**, 91: 119-130.

Benko M, Elo P, Ursu K, Ahne W, Lapatra SE, Thomson D, Harrach B, 2002. First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. **J virol**, 76(19):10056-10059.

Bertolotti-Ciarlet A, White LJ, Chen R, Prasad BVV, Estes MK, 2002. Structural requirements for the assembly of norwalk virus-like particles. **J Virol**, 76 (8): 4044-4055.

Bhattacharya R, Sahoo, GC, Nayak, MK, Rajendran K, Dutta, P, Mitra, U, Bhattacharya, MK, Naik, TN, Bhattacharya, SK, Krishnan, T, 2007 Infection, Genetics and Evolution. **Elsevier**, 7 : 229-238.

Billgren M, Christenson B, Hedlund K-O, Vinjé J, 2002 Epidemiology of Norwalk-like human caliciviruses in hospital outbreaks of acute gastroenteritis in the Stockholm area in 1996. **J Infect**, 44: 26-32.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ, 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, 2:1281-1283.

Bon F, Fascia P, Dauvergne M, Tenenbaum D, Planson H, Petion AM, Pothier P, KoWi E 1999. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. **J Clin Microbiol**, 37: 3055-3058.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Werthem-Ven-Dilleen P:ME, Noordaa JVD 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, 28: 495-503.

Borges AMT, Teixeira JMS, Costa PSS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco RC, Brito WMED, Leite JPG, Cardoso DDP, 2006. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the west Central Region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 101(7): 721-724.

Brinker JP, Blacklow NR, Hemmann JE, 2000. Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines. **Arch Virol**, 145: 1847-1856.

Brown M, Grydsuk JD, Fortsas E, Petric M, 1996. Structural features unique to enteric adenoviruses. **Arch Virol Suppl**, 12:301-7.

Buesa J, Collado B, López-Andújar P, Abu-Mallouh R, Díaz IR, Díaz AG, Prat J, Guix S, Llovet T, Prats G, Bosch A, 2002. Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. **J Clin Microbiol**, 40: 2854-59.

Cardoso DDP, Martins RMB, Kitajima, EW, Barbosa AJ, Camarota SCT, Azevedo MSP, 1992. Rotavirus e adenovirus em crianças de 0-5 anos hospitalizadas com ou sem gastroenterite em Goiânia – GO, Brasil. **Rev. Inst. Med Trop S Paulo**, 34(5): 433-439.

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.

Cardoso DDP, Soares CMA, Souza MBLD, Azevedo MSP, Martins RMB, Queiróz DAO, Brito WMED, Rácz ML 2003. Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 98: 25-29.

Carraro E, Perosa AHS, Siqueira I, Pasternak J, Martino MDV, 2008. Rotavirus infection in children and adult patient attending in a tertiary hospital of São Paulo, Brazil. **Braz Journ of Infect Dis**, 12(1):44-6.

Caul EO, 1996. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part I. The clinical and diagnostic perspective. **J Clin Pathol**, 49: 874-80.

Castilho JG, Resque HR, Munford V, Fagundes-Neto U, Rácz ML, 2003. Detection of norovirus and astrovirus mixed infections in stool samples of

children with gastroenteritis from São Paulo, Brazil. ***Virus Reviews & Research***, 8: 235-236.

Chapron CD, Ballester NA, Margolin AB, 2000. The detection of astrovirus in sludge biosolids using an integrated cell culture nested PCR technique. ***J Appl Microbiol***, 89: 11-15.

Chatterjee PK, Vayda ME, Flint SJ, 1986. Identification of proteins and protein domains that contact DNA within adenovirus nucleoprotein cores by ultraviolet light crosslinking of oligonucleotides 32P-labelled in vivo. ***J Mol Biol***, 188:23-37.

Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshira K, Honma S, 2000. Sapporo virus: history and recent findings. ***J Infect Dis***, 181: S303-8.

Chris A, 2003. Norwalk-like viruses: When the runs can slow you down. ***CMA J***, 168 (1): 64-65.

Cichocki M, Singer G, Beyerlein S, Zeder SL, Schober P, Höllwarth M, 2008. A case of necrotizing enterocolitis associated with adenovirus infection in a term infant with 22q11 deletion syndrome. ***J of Pediatr Surg***, 43, E5–E8.

Chou R, Smits AK, Huffman LH, Korhuis PT, 2005a. screening for Human Immunodeficiency Virus Pregnant Women: ***Evidence Synthesis***, Number 39. Disponível em [www.ahrq.gov/preventiveservices](http://www.ahrq.gov/preventiveservices)

Clark N, Lambden PR, 2000. Organization and expression of calicivirus genes. ***J Infect Dis***, 181: S309-16.

Clark N, Lambden PR, 2001. The molecular biology of human caliciviruses. ***Novartis Found Symp*** 238:180-96.

Clark HF, Bernstein DI, Dennehy PH, Offit P, Pichichero M, Treanor J, et al. 2004. Safety, efficacy, and immunogenicity of a live, quadrivalent human-bovine reassortant rotavirus vaccine in healthy infants. ***J Pediatr***,;144:184-90.

Clark DA, 1992. Controversies in reproductive immunology. ***Crit Ver Immunol***, 11:215-247.

Costa PSS; Cardoso DDP; Gris SJFE; Silva PAS; Fiaccadori F; Souza MBLD; Santos RAT, 2004. Infecções e reinfecções por *Rotavirus A*: genotipagem e implicações vacinais. ***J. Pediatr***, 80:119-22.

Cubitt WD, Mswiggan DA, Moore W, 1979. Winter vomiting disease caused by calicivirus. ***J Clin Pathol***, 32: 786-793.

Cubitt WD, Jiang XI, Wang J, Estes MK, 1994. Sequence similarity of human caliciviruses and small round structured viruses. ***J Med Virol***, 43: 252-258.

Cubitt WD, Mitchell DK; Carter MJ, Willcocks MM, Holzel H, 1999. Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a pediatric bone marrow transplant unit. **J Med Virol**, 57: 313-321.

Cunliffe NA, Dove W, Gondwe JS, Thindwa BMD, Greensill J, Holmes JL, Bresee 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.

Daniels NA, Bergmire-Sweet DA, Schwab KJ, Hendricks KA, Reddy S, Rowe SM, Frankhauser RL, Monroe SS, Atmar RL, Glass RI, Mead P, 2000. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with norwalk-like viruses: first molecular traceback to deal sandwiches contaminated during preparation. **J Infect Dis**, 181: 1467-70.

De Grazia S, Giammanco GM, Colomba C, Cascio A, Arista S, 2004. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Italian children with gastroenteritis. **Clin Microbiol Infect**, 10: 1025-1029.

De Jong JC, Wigand R, Kidd AH, Wadel G, Kapsenberg JG, Muzerie CJ, Weemenbol AG, Firtf RG 1983. Candidate Adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. **J Med Virol**, 11:215-231.

De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van Dillen P, Van Doormum GJ, Khoo SH & Hierholzer JC, 1999. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. **J Clin Microbiol**, 37, 3940–3945.

Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCrotchan FE, Grez M, Rubsarnen-Waigmann H, Mullins FI, 1993. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-I env genes. **Science**, 262: 1257-1261.

Denno DM, Stapp JR, Boster DR, Qin X, Clausen CR, Dei Beccaro KH, Swerdlow DL, Braden CR, Tarr PI, 2005. Etiology of diarrhea in pediatric outpatient settings. **Pediatr Infect Dis J**, 24: 142-148.

Dennehy PH, Nelson SM, Spangenberger 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.

Desselberger U, 2000. Gastroenteritis viruses: research update and perspectives. Gastroenteritis viruses, Novartis Foundation Symposium 238, London, UK, 16-18 May. **Mol Med Today**, 6: 383-384.

Dolin R, Blacklow NR, OuPont H, Formal S, Buscho RF, Kasel JA, Chames RP, Homick R, Chanock RM, 1971. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. **J Infect Dis**, 123: 307-312.

Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, 1972. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Bio/Med*, 140: 578-83.

Dolin R, Levy AG, Wyatt RG, Thomhill TS, Gardner JO, 1975. Viral gastroenteritis induced by the Hawaii agent: jejunal histopathology and serologic response. *Am J Med*, 59: 761-767.

Domingues AL; Morais AT; Cruz RL; Moreira LP; Gouvea VS, 2008. Rotavirus-associated infantile diarrhea in Uberaba, Minas Gerais, on the wake of the Brazilian vaccination program. *J Clin Virol*, 43(3): 298-301.

Estes MK, Crawford SE, Penaranda ME, Petrie BL, Burns JW, Chan WK, Ericson B, Smith GE, Summers MD, 1987. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J Virol*, 61:1488-1494.

Estes MK, Cohen, 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*, 53:410-449.

Estes MK, 2001. Rotaviruses and their replication. In: Knipe DM and Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B Strais SE. *Virology*, 4<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1747-1785

Everitt E, Lutter L, Philipson L, 1975. Structural proteins of adenoviruses. XII. Location and neighbor relationship among proteins of adenovirion type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation and chemical cross-linking. *Virol*, 67:197-208.

Farkas T, Zhong W, Jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martinez N, Morrow AL, Ruiz-Palacios G, Pickering LK, Jiang X 2004. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol*, 149(7):1309- 23.

Ferreira RG, Cavalcante F, De Brito EM, De Paula DDM, 2005. Seroprevalencia del citomegalovirus em gestantes del Hospital Materno Infantil de Goiânia. *Prog Obstet Ginecol*, 48(3):121-7.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Morris CA, 1975. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet*, 1:4-5.

Foley B, O'Mahony J, Morgan SM, Hill C, Morgan JG, 2000. Detection of sporadic cases of Norwalk-like virus and astrovirus infection in a single Irish hospital from 1996 to 1998. *J Clin Virol*, 17: 109-117.

Frankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI 1998. Molecular epidemiology of Norwalk-like viruses in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis*, 178: 1571-8.

Fukuda S, Kuwayama M, Taka OS, Shimazu Y, Miyazaki K, 2006. Molecular epidemiology of subgenus F adenoviruses associated with pediatric gastroenteritis during eight years in Hiroshima Prefecture as a limited area. **Arch Virol**, 151:2511-2517.

Gabbay YB, Resque HR, Gomes MLC, Alves AS, Mascarenhas IIP, Linhares AC, 2000. Astrovirus as a cause of infantile gastroenteritis in the Pará State, Brazil: setting up of the laboratory methodology. **Virus Reviews & Research**, 5(2): 165.

Gaggero A, O'Ryan M, Noel JS, Glass RI, Monroe SS, Mamani N, Prado V, Avendaño LF, 1998. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. **J Clin Microbiol**, 36: 3691-3693.

Giordano MO, Ferreyra LJ, Isa MI, Martinez LC, Yudowsky SI, Nates SV, 2001. The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children in Cordoba City, Argentina: an insight of disease burden. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 43:193-197.

Giordano MO, Martinez LC, Isa MB, Rearte MP, 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.

Gordon I, Ingraham HS, Koms RF, 1947. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. **J Exp Med**, 86: 409-22.

Glass RI, Noel JS, Mitchell DK, 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.

Glass PJ, White LJ, Ball 1M, Lepare-Goffart I, Hardy ME, Estes MK, 2000. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. **J Virol**, 74: 6581-6591.

Glass RI, Bresee JS, Parashar UD, Jiang B, Gentsch J, 2004. The future of rotavirus vaccines: a major setback leads to new opportunities. **Lancet**, 363:1547-50.

Glass RI, Bresee JS, Parashar U, Turcios R, Fischer T, Jiang B, 2005. Rotavirus vaccines: past, present, and future. **Arch Pediatr**, 12:844-7.

Glass RI, Noel J, Ando RF, Belhot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee JS, Monroe SS, 2000. The epidemiology of enteric caliciviruses from human: a reassessment using new diagnostic. **J Infect Dis**, 181(2): s 254-261.

Gray EW, Angus KW, Snodgrass DR, 1980. Ultrastructure of the small intestine in astrovirus-infected lambs. **J Gen Virol**, 49: 71-82.

Green J, Gallimore CI, Norcott JP, Lewis D, Brown DWG, 1995. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV –associated gastroenteritis. *J Med Virol*, 47: 392-398.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neil fi, Studdert MJ, Thiel H-J, 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis*, 181: S322-330.

Greenberg HB, Kapikian AZ, 1978. Detection of norwalk agent antibody and antigenicity solid-phase radioimmunoassay and imune adherence hemagglutination assay. *J Am Vet Med Assoc*, 173:620-623.

Greenberg HB, Wyatt RO, Valdesuso J, Kalica AR, London WT, Chanock RM, Kapikian AZ, 1978. Solid-phase microtiter radioimmunoassay for detection of the norwalk strain of acute nonbacterial, epidemic gastroenteritis virus and its antibodies. *J Med Virol*, 2: 97-108.

Greenberg HB, Flores J, Kalica AR, Wyatt RG, Jones R, 1983b. Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the W and DS-1 strains of human rotavirus. *J Gen Virol*, 64:313-320.

Greenberg HB, McAuliffe V, Valdesuso J, Wyatt R, Flores J, Kalica A, Hoshino Y, Singh N, 1983c. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 39:91-99.

Greenberg HB, Matsui SM, 1992. Astroviruses and caliciviruses: emerging enteric pathogens. *Infect Agents Dis*, 1: 71-91.

Greening GE, Mirarns M, Berke T, 2001. Molecular epidemiology of Norwalk-like viruses associated with gastroenteritis outbreaks in New Zealand. *J Med Virol*, 64: 58-66.

Grimm AC, Cashdollar JL, Williams FP, Fout GS, 2004. Development of the astrovirus RT-PCR detection assay for use with conventional, real-time, and integrated cell culture/RT -PCR. *Can J Microbiol*, 50: 269-278.

Guerrero ML, Noel JS, Mitchell DK, Calva JJ, Morrow AL, Martínez J, Rosales G, Velásquez 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 J*, 17: 723-727.

Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N, Simó M, Bosch A, Pinto RM, 2002. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol*, 140: 133-139.

Guix S, Bosch A, Ribes E, Martínez LD, Pintá RM, 2004. Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells. *Virology*, 319: 249-261.

Guix S, Caballero S, Bosch A, Pintá RM, 2005. Human astrovirus C-terminal NSP1a protein is involved in RNA replication. *Virology*, 333: 124-131.

Harsi CM, Rolim DP, Gomes SA, Gilio AE, Stewien KE, Baldacci ER & Candeias JÁ, 1995. Adenovirus genome types isolated from stools of children with gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil. *J Med Virol*, 45, 127–134.

Hedlund KO, Rubilar-Abreu E, Svensson L, 2000. Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994-1998. *J Infect Dis*, 181 (Suppl2): S275-80.

Herring AJ, Inus NF, Ojen CK, Snodgrass DR, Menzies JD, 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol*, 16 (6): 473-477.

Herrmann JE, Perron-Henry DM, Blacklow NR, 1987. Antigen detection with monoclonal antibodies for the diagnosis of adenovirus gastroenteritis. *J Infect Dis*, 155: 1167-1171

Herrmann JE, Hudson RW, Perron-Henry DM, Kurtz ffi, Blacklow NR, 1988. Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. *J Infect Dis*, 158: 182-185.

Herrmann JE, Nowak NA, Perron-Henry DM, Hudson RW, Cubitt WD, Blacklow NR, 1990. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J Infect Dis*, 161:226-229.

Herrmann JE, Taylor DN, Echeverria P, Blacklow NR, 1991. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N Engl J Med*, 324:1757-1760.

Hierholzer J, 1992. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev*, 5(3):262-274.

Hierholzer JC, Halomen PE, Dahlen PO, 1993. Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry. *J Clin Microbiol Rev*, 31:1886-1891.

Hierholzer JC, 1995. **Adenoviruses**. In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, (eds.), Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, 7<sup>th</sup> ed. American Public Health association, Washington, pl 169-188.

Hodges RO, Maccorkle LP, Badger OF, Curtis C, Dingle JH, Jordan WS, 1956. A study of illness in a group of Cleveland families: XI. The occurrence of gastrointestinal symptoms. *Am J Hyg*, 64: 349-56.

Honra S, Nakata S, Numata K, Kogawa K, Yarnashita T, Oseto M, Jiang X, Chiba S, 1998. Epidemiological study of prevalence of genotype II human calicivirus (Mexico virus) infections in Japan and Southeast Asia as determined by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol*, 36: 2481-2484

Horwitz MS, Maizel JV Jr, Scharff MD, 1970. Molecular weight of adenovirus type 2 hexon polypeptide. *J Virol*, 6:659-571.

Horwitz, M. S 2001. Adenoviruses. In **Fields Virology**, 4th edn, pp. 2301–2326. Edited by D. M. Knipe, M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman & S. E. Straus. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

Hoshino Y, Kapikian AZ, 1996. Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes. **Arch Virol Suppl**, 12:99-111.

Hutson AM, Atmar RL, Marcus DM, Estes M, 2003. Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to H histo-blood group antigens. **J Virol**, 77: 405-15.

Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, Yoshika W AM, Kato N, Okabe N, 2000. Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. **J Infect Dis**, 181: S270-4.

Jakab F, Walter JE, Berke T, Matson DO, Mitchell DK, Szücs G, 2003. Molecular characterization and sequence analysis of human astroviruses circulating in Hungary. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 39: 97-102.

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.

Jiang x, Espul C, Zhong WM, Cuello H, Matson DO, 1999. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. **Arch Virol**, 144: 2377-2387.

Jiang X, Wilton N, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, Barret E, Guerrero M, Rujz-Palacios, Green KY, Green J, Hale AD, Estes MK, Pickering LK, Matson, DO, 2000. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. **J Infect Dis**, 181: S349-59.

Jones II MS, Harrach B, Ganac RD, Gozum MMA, Cruz WP, Riedel B, Pan C, Delwart EL, Schnurr D P, 2007. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. **J VIROL** 81: 5978–84.

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

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, 2001. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, **Virology**, 4<sup>th</sup> ed. Lippincorr Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1787-1833.

Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, Singh N, Schonberger LB, Feldman R, Greenberg HB, 1982a. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute gastroenteritis. **Ann Intern Med**, 96:756-761.

Kaplan JE, Feldman R, Campbell D, Lookabaugh C, Gary W, 1982b. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. **Am J Public Health**, 72:1329-1332.

Kirkwood CD, Coulson BS, Bishop RF, 1996. G3P2 rotaviruses causing diarrheal disease in neonates differ in VP4, VP7 and NSP4 sequence from G3P2 strains causing asymptomatic neonatal infection. **Arch Virol**, 141:1661-1676.

Kirkwood CD, Bishop RF, 2001. Molecular detection of human calicivirus in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia during 1999. **J Clin Microbiol**, 39:2722-24.

Kidd AH, Madeley CR, 1981. In vitro growth of some fastidious adenoviruses from stool specimens. **J Clin Pathol**, 34:213-216.

Komoriya T, Kohno H, Chiba, JPN, Kimura A, Ushijima H, 2003. The Development of Sensitive Latex Agglutination Tests for Detecting Astroviruses (Serotypes 1 and 3) from Clinical Stool Specimen. **JARMAM**, 2:103-114.

Koopmans MPG, Bijen IHL, Monroe SS, Vinjé J 1998. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in the Netherlands. **Clin Diagn Lab Immunol**, 5:33-37.

Koopmans M, Bonsdorff C-H, Vinjé J, Medici D, Monroe S, 2002. Foodborne viruses. **FEMS Microbiol Reviews**, 26:187-205.

Krisher KK, Menegus MA, 1987. Evaluation of three types of cell culture for recovery of adenovirus from clinical specimens. **J Clin Microbiol**, 25:1323-1324.

Kurtz JB, Lee TW, Craig JW, Reed SE, 1979. Astrovirus infection in volunteers. **J Med Virol** 3: 221-230.

Kurtz JB, Lee TW, 1984. Human astrovirus serotypes. **Lancet**, 2:1405.

Kurtz JB, 1988. **Astroviruses**. In MJG Farthing (ed), *Viruses and the gut*. Proceedings of the Ninth British Society of Gastroenterology. Smith Kline and French International Workshop, Windsor, Berks, UK, 2-4 October. p. 84-87.

Lee TW, Kurtz JB, 1981. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. **J Gen Virol**, 57: 421-424.

Lew JF, Moe CL, Monroe SS, Allen JR, Harrison BM, Forrester BD, Stine SE, Woods PA, Hierholzer JC, Hemmann 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.

Lewis TL, Greenberg HB, Hemmann JE, Smith LS, Matsui SM, 1994. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA

polymerase motif, and expression of a viral structural protein. **J Virol**, 68: 77-83.

Li L, Phan TG, Nguyen TA, Kim KS, Seo JK, Shimizu H, Suzuki E, Okitsu S, Ushijima H, 2005. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. **Microbiol Immunol**, 49(2):121-128.

Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, Lependu J, Baric R, 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. **Nat Med**, 9: 548-553.

Linhares AC, 2000. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para seu controle. **Cad Saúde Publ**, 16:1-29.

Linhares AC, Bresee JS, 2000. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. **Rev Panam Salud Publica**, 8:305-31.

Liu CY, Shen KL, Wang SX, Liu YY, Zhaori GT, 2004. Astrovirus infection in young children with diarrhea hospitalized at Beijing children's hospital. **Chin Med J**, 117: 353-356.

Lopman BA, Brown DW, Koopmans M, 2002. Human calicivirus in Europe. **J Clin Microbiol**, 24: 137-160.

Lopman BA, Adak GK, Reacher MH, Brown DW, 2003. Two epidemiologic patterns norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. **Emerg Infect Dis**, 9 (1): 71- 77.

Lopman BA, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negredo A, Buesa J, Schereier E, Reacher M, Brown D, Gray J, Iturriza M, Gallimore C, Bottiger B, Hedlund K, Torvén M, Bonsdorff C, Maunula L, Poljsak-Prijatelj M, Zimsek J, Reuter G, Szücs G, Melegh B, Svennson L, Duijnhoven Y, Koopmans M, 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. **The Lancet**, 363: 682-87.

Lourenço MH, Nicolas LC, Cohen L, Scherrer R, Bricout F, 1981. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. **Ann. Virol (Inst. Pasteur)**, v.132, p.161-173.

Lovmar L, Fock C, Espinoza F, Bucardo F, Syvänen A-C, Kåre Bondeson K 2003. Microarrays for Genotyping Human Group A Rotavirus by Multiplex Capture and Type-Specific Primer Extension. **J of Clinl Microbiol**, 41: 5153-5158.

Ludert JE, Feng N, Yu JH, Broome RL, Hoshino Y, Greenberg HB, 1996. Genetic mapping indicates that VP4 is the rotavirus cell attachment protein *in vitro* and *in vivo*. **J virol**, 70:487-493.

Lukashov VV, Goudsmit J, 2002- Evolutionary relationships among *Astroviridae*. **J Gen Virol**, 83: 1397-1405.

Ma Y, Mathews MB 1996. Structure, function and evolution of adenovirus-associated RNA; a phylogenetic approach. **J Virol** 70:5083-5099.

Maizel JV Jr, White Do, Scharff MD, 1968. The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top, components and structure of the virion. **Virology**, 36:126-136.

Mclver CJ, Hansman G, White P, Doultree JC, Catton M & Rawlinson WD, 2001. Diagnosis of enteric pathogens in children with gastroenteritis. **Pathology**, 33, 353–358.

Madeley CR, Cosgrove BP, 1975. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. **Lancet**, 2:451-2.

Madeley D, 1993. Viruses and diarrhoea-Where are we now? **APMIS**, 101: 497-504.

Magalhães GF, Nogueira PA, Grava AF, Penati M, Silva LHP, Orlandi PP, 2007. Rotavirus and adenovirus in Rondonia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 102(5): 555-557.

Maldonado Y, Cantwell M, Old M, Hill D, Sanchez ML, Logan L, Millan-Velasco F, Valdespino Sepulveda J, Matsui SM, 1998. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. **J Infect Dis**, 178: 334-339.

Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin F, Fey RE, Caul EO, 2000. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus in a hotel restaurant. **Epidemiol Infect**, 124: 481-487.

Marie-Cardine A, Gourelain K, Mouterde O, Castignolles N, Hellot MF, Mallet E, Buffet- Janvresse C, 2002. Epidemiology of acute viral gastroenteritis in children hospitalized in Rouen, France. **Clin Infect Dis**, 34: 1170-1178.

Matsui SM, Greenberg HB, 1996. **Astroviruses**. In BN Fields, DM Knipe, PM Holey, RM Chanock, TP Monath, JL Melnick, Roizman B, SE Straus (eds), *Fields Virology*, 3th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 811-824.

Matsui SM, Greenberg HB, 2001. **Astroviruses**. In BN Fields, DM Knipe, PM Holey, RM Matsui SM, Kiang D, Ginzton NH, Chew T, Geingenmüller-Gnirke U 2001. *Molecular biology of astroviruses: selected highlights*. **Novartis Found Symp**, 238: 219-233; discussion p. 233-236.

Mattick KL, Green J, Punia P, Belda FJ, Gallimore CI, Brown DWG, 2000. The heteroduplex mobility assay (HMA) as a pre-sequencing screen for Norwalk-like viruses. **J Virol Methods**, 87:161-169.

Maunula L, Piiparinen H, Bonsdorff CH, 1999. Confirmation of Norwalk-like virus amplicons after RT-PCR by microplate hybridization and direct sequencing. **J Virol Methods**, 83: 125-134.

Maunula L, Kalso S, Von Bonsdorff CH, Pôrikä A, 2004. Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. **Epidemiol Infect**, 132: 737-743.

Mclver CJ, Palombo EA, Doultree JC, Mustafa H, Marshall JA, Rawlinson WD, 2000. Detection of astrovirus gastroenteritis in children. **J Virol Methods**, 84: 99-105

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.

Meeroff JC, Schreiber DS, Trier JS, Blacklow NR, 1980. Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. **Ann Intern Med**, 92: 370-373.

Meyers G, 2003. Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. **J Biol Chem**, 278: 34051-34060.

Méndez E, Fémandez-Luna T, López S, Méndez-Toss M, Arias CF, 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. **J Virol**, 76: 7996-8002.

Méndez E, Salas-Ocampo MPE, Munguía ME, Arias CF, 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. **J Virol**, 77: 11378-11384.

Méndez- Toss M, Romero-Guido P, Munguía E, Méndez E, Arias CF, 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. **J Gen Virol**, 81: 2891-2897.

Middleton PJ, 1996. Viruses that multiply in the gut and cause endemic and epidemic gastroenteritis. **Clin Diagn Virol**, 6:93-101.

Miranda VQS, Rocha VPF, Assis RM, Mattos G, Dantas MHP, Daufenbach LZ, Moura L, Hatch D, Silva JA, Leite JPG, 2003. Acute gastroenteritis associated with human astrovirus in Itatiaia, Rio de Janeiro, Brazil. **Virus Reviews & Research**, 8: 237.

Miranda VQS, Fernandes O, Mattos G, Assis RM, Fialho AM, Leite JPG, 2004. Molecular detection and characterization of human astrovirus in cases of acute gastroenteritis. **Virus Reviews & Research**, 9: 81.

Mitchell DK, Matson DO, Jiang X, Berke T, Monroe SS, Carter MJ, Willcocks MM, Pickering LK, 1999. Molecular biology of epidemiology childhood astrovirus infection in child care centers. **J Infect Dis**, 180: 514-517.

Mitchell DK, 2002. Astrovirus gastroenteritis. ***Pediatr Infect Dis J***, 21: 1067-1069.

Moe CL, Allen JR, Monroe SS, Gary, IR. HE, Humphrey CD, Herrmann JE, Blacklow NR, Carcamo C, Koch M, Kim KH, Glass RI, 1991. Detection of astrovirus in pediatric stool samples by immunoassay and RNA probe. ***J Clin Microbiol***, 29: 2390-2395.

Mori Y, Borgan MA, Ito N, Sugiyama M, Minamoto N, 2002. Diarrhoeal inducing activity of avian rotavirus NSP4 glycoproteins, which differ greatly from mammalian rotavirus NSP4 glycoproteins in deduced amino acid sequences, in suckling mice. ***J Virol***, 76:5829-5834.

Morris AP, Scott JK, Ball JM, Zeng CQ, O'Neal WK, Estes MK, 1999. NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca(2+) mediated I(-) influx into intestinal crypts of CF mice. ***Am J Physiol***, 277:431-444.

Morris Saffold Jones II, Bala'zs Harrach, Robert D. Ganac, Mary M. A. Gozum, Wilfred P. Dela Cruz, Brian Riedel, Chao Pan, Eric L. Delwart, and David PS, 2007. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. ***J Virol***, 81:5978-5984

Monroe SS, Stine SE, Gorelkin L, Herrmann JE, Blacklow NR, Glass RI, 1991. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. ***J Virol***, 65: 641-648.

Monroe SS, Jiang B, Stine SE, Koopmans M, Glass RI, 1993. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of *Astroviridae* as a new family of RNA viruses. ***J Virol***, 67:3611-3614.

Mounts A W, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI, 2000. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. ***J Infect Dis***, 181: S284- 7.

Mustafa H, Palombo EA., Bishop RF, 1998. Improved sensitivity of astrovirus-specific RT-PCR following culture of stool samples in CaCO-2 ***J Clin Virol***, 11: 103-107.

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.

Murata T, Katsushima N, Mizuta K, Muraki Y, Hongo S, Matsuzaki Y, 2007. Prolonged norovirus shedding in infants  $\leq 6$  months of age with gastroenteritis. ***Pediatr Infect Dis J***, 26(1):46-49.

Naficy AB, Rao MR, Holmes JL, Abu-Elyazeed R, Savarino SI, Wierzba TF, Frenck RW, Monroe SS, Glass RI, Clemens M, 2000. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. **J Infect Dis**, 182: 685-690.

Nakata S, Honrna S, Numata K, Kogawa K, Ukae S, Adachi N, Jiang X, Estes MK, Gatheru Z, Tukei PM, Chiba S, 1998. Prevalence of human calicivirus infections in Kenya as determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. **J Clin Microbiol**, 36 (11): 3160- 3163.

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

Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, Larson G, Johansen K, Ekspong A, Svensson L, 2003. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. **J Virol**, 77:13117-124.

Noel J, Manssor A, Thaker U, Hermann J, Perron-Henry D, Cubbit WD, 1994. Identification of adenovirus in faeces from patients with diarrhea at the hospitals for sick children, London, 1989-1992. **J Med Virol**, 43:84-90.

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

Norrby E, 1969. The structural and functional diversity of adenovirus capsid components. **J Gen Virol**, 5:221-236.

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

Oh DY, Silva PA, Hauroeder B, Diedrich S, Cardoso, DDP, Schreier E, 2006. Molecular characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. **Arch Virol**, 151:1199-1206.

Okitsu-Negishi S; Nguyen TA, Phan TG, Ushijima H, 2004. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. **Pediatr Int**, 46:245-252.

Pang X, Joensuu J, Vesikari T, 1999. Human calicivirus-associated sporadic gastroenteritis in Finnish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. **Pediatr Infect Dis J**, 18: 420-6.

Pang X, Honma S, Nakata S, Vesikari T, 2000. Human calicivirus in acute gastroenteritis of young children in the community. **J Infect Dis**, 181: S288-94.

Pager CT, Steele AD, 2002. Astrovirus-associated diarrhea in South African adults. **Clin Infect Dis**, 35: 1452-1453.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI, 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. ***Emerg Infect Dis***, 9:565-72.

Parashar UD, Dow L, Frankhauser RL, Humprey CD, Miller J, Ando T, Williams KS, Eddy CR, Noel JS, Ingram T, Bresee JS, Monroe SS, Glass RI, 1998. An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwich: implications for the control transmission by food handlers. ***Epidemiol Infect***, 121: 615-621.

Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR, 1977. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by norwalk agent. ***N Engl J Med***, 297: 86-89.

Patel MM, Windowson M, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD, 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. ***Emerg infect dis***, 14(8):1224-1231.

Prasad BVV, Chiu W 1994. Structure of rotaviruses. In Raming RF (ed.), ***Rotaviruses***, ed. Springer-Verlag, Berlin, p 9-29.

Prasad BVV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK 1999. X-ray crystallographic structure of the norwalk virus capsid. ***Science***, 286(5438): 287-290.

Pring-Akerbom P, Trijssenaar FEJ, Adrian T, Hoyer H 1999. Multiplex polymerase chain reaction for subgroup-specific detection of human adenoviruses in clinical samples. ***J Med Virol***, 58:87-92.

Pennap G, Pager CT, Peenze I, De Beer MC, Kwaga JKP, Ogalla WN, Umoh JU, Steele AD, 2002. Epidemiology of astrovirus infection in Zaria, Nigeria. ***J Trop Pediatr***, 48: 98-101.

Pereira, AC, Jesus, NR, Lage, LV, Levi, RA, 2005. Immunity in the normal pregnancy and in the patient with systemic lupus erythematosus (SLE). ***Rev Brás de Reumatol***, 45(3): 134-140.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Candeias JAN, Rácz ML, Linhares AC, Gabbay YB, Trabulsi LR, 1983. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. ***J Hyg Camb***, 90: 117-125.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Andrade ZP, Castro L, 1985. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus. ***J Virol Methods***, 10: 21-28.

Perez-Schael I, Guntinas MJ, Perez M, Pagone V, Rojas AM, González R, et al. 1997. Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. ***N Engl J Med***, 337:1181-7.

Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H, 2004. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. **J Med Virol**, 73: 256-261.

Phillips AD, Rice SI, Walker-Smith JA, 1982. Astrovirus with human small intestinal mucosa. **Gut**, 23: A923-924.

Rácz ML, 2004. Diagnóstico laboratorial das infecções virais. In LR Trabulsi, F Alterthum (eds), **Microbiologia**, 43 ed. Editora Atheneu, São Paulo, p. 553-564.

Reddy PS, Ganesh S, Knowles N, Kaleko M, Connelly S, Bristol A, 2005. Complete sequence and organization of the human adenovirus serotype 46 genome. **Virus Resp**, 1-10.

Richards GP, Watson MA, Kingsley DH, 2004. A SYRB green, real-time RT-PCR method to detect and quantitate norwalk virus stools. **J Virol Methods**, 116: 63-70.

Rodriguez-Baez N, O'Brien R, Qiu SQ, Bass DM, 2002. Astrovirus, adenovirus, and rotavirus in hospitalized children: prevalence and association with gastroenteritis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 35: 64-68.

Rodríguez-Guillén L, Viaai E, Alcalá AC, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE 2005. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. **J Clin Virol**, 33: 104-109

Rowe W.R.; Huerbner R.J.; Gilmore, L.K.; Parrot R.H. & Ward T.G, 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. **Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)**, 84: 570-573.

Ruuskanen O, Meurman O, Akusjarvi G, 1997. Adenoviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, **Clin Virol**, Churchill, Livingstone, p. 525-547.

Sair AI, D' Souza DH, Moe CL, Jaykus L, 2002. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. **J Virol Methods**, 100: 57-69.

Sánchez-Fauchier A, Carrascosa AL, Carrascosa JL, Otero A, Glass RI, Lopez JA, San Martin C, Melero JA, 1994. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. **Virology**, 201: 312-320.

Sakai. Y, Nakata S, Honma S, Tatsumi M, Numata-Kinoshita K, Chiba S, 2001. Clinical severity of Norwalk Virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. **Pediatr infect Dis J**, 20 (9): 849-53.

Sakamoto T, Negishi H, Wang QH, Akihara S, Kim B, Nishimura S, Kaneshi K, Nakaya S, Veda 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.

Santos RAT, Borges AMT, Costa PSS, Teixeira JMS, Giuliano LG, Leite JPG, Cardoso DDP, 2007. Astrovirus infection in children living in the Central West region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 102(2): 209-13.

Santos JS, Alfieri AF, Leite JPG, Skraba I, Alfieri AA, 2008. Molecular epidemiology of the human group A rotavirus in the Paraná State, Brazil. **Braz. arch. biol. Technol**; vol.51 no.2

Santos NSO, 2002, Romano MTV, Wigg MD 2002 Viroses entéricas. **Introdução à virologia humana**, 13 ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 59-74.

Sasaki J, Kusuhara Y, Maeno Y, Kobayashi N, Yamashita T, Sakae K, Takeda N, Tanigushi K, 2001. Construction of an infectious cDNA clone of aichi virus (a new member of the family Picomaviridae) and mutational analysis of a stem-loop structure at the 5' end of the genome. **J Virol**, 75: 8021-8030.

Sawyer LA, Murphy JJ, Kaplan JE, Pinsky PF, Chacon D, Walmsley S, Schonberger LB, Phillips A, Forward K, Goldman C et al. 1988. 25 to 30 nm virus particle associated with a hospital outbreak of acute gastroenteritis with evidence for airborne transmission. **Am J Epidemiol**, 127: 1261-71.

Shinagawa M, Lida Y, Matsuda A, Tsukiyama T, Sato G, 1987. Phylogenetic relationships between adenoviruses as inferred from nucleotide sequences of inverted terminal repeats. **Gene**, 55:85-93.

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.

Sebire NJ, Malone M, Shah N, Anderson G, Gaspar HB, Cubitt WD, 2004. Pathology of astrovirus associated diarrhea in a paediatric bone marrow transplant recipient. **J Clin Pathol**, 57: 1001-1003.

Shastri S, Doane AM, Gonzales J, Upadhyayula V, Bass DM 1998. Prevalence of astroviruses in a children's hospital. **J Clin Microbiol**, 36: 2571-2574.

Shenk T, 2001. Adenoviridae: the viruses and their replication. **Virol**, 4<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.2265-2230.

Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneckarn N, Ushijima H 2007. Na outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru City, Japan. **Elsevier**, 7:279-284.

Silva AMV, Leite EG, Assis RMS, 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.

Simonsen L, Viboud C, Elixhauser A, Taylor RJ, Kapikian AZ, 2005. More on RotaShield and intussusception: the role of age at the time of vaccination. **J Infect Dis.**;192 Suppl 1:S36-43.

Soares CC, Volotã OEM, Albuquerque MC, da Silva FM, de Carvalho TR, Nozawa CM, Linhares RE & Santos N, 2002. Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. **J Clin Virol**, 23, 171-177.

Souza M, Constantini V, Azevedo MSP, Saif LJ, 2007. A human norovirus-like particle vaccine adjuvanted with ISOOM or mLT induces cytokine and antibody responses and protection to the homologous GII.4 human norovirus in a gnotobiotic pig disease model. Elsevier. **Vaccine**, 25: 8448-59

Stewien KE, Durigon EL, Tanaka H, Gilio AE, 1991. Ocorrência de astrovirus humanos na cidade de São Paulo, Brasil. **Rev Saude Publica**, 25: 157-158.

Stewart PL, Fuller SD, Burnet RM, 1993. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between x-ray crystallography and electron microscopy. **Embo J**, 12:2589-2599.

Suzuki N, Ueno T, Yamashita T, Fujinaga K, 1981. Grouping of adenoviruses and identification of restriction endonuclease cleavage patterns of adenovirus DNAs using infected cell DNA: Simple and practical methods, **Microbiol Immunol**, 25:1291-1301.

Tai JH, Ewert MS, Belliot G, Glass RI, Monroe SS, 2003. Development of a rapid method using nucleic acid sequence-based amplification for the detection of astrovirus. **J Virol Methods**, 110:119-127.

Tanaka H, Kisielius JJ, Veda M, Glass RI, Joazeiro PP, 1994. Intrafamilial outbreak of astrovirus gastroenteritis in São Paulo, Brazil. **J Diarrhoeal Dis Res**, 12: 219-221.

Taylor MB, Grabow WOK, Cubitt WD, 1997. Propagation of human astrovirus in the PLC/PRF/5 hepatoma cell line. **J Virol Methods**, 67:13-18. **J Virol** 70:6973-6981.

Tian P, Ball JM, Zeng CQ, Estes MK, 1996. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity.

Treviño M, Prieto E, Peñalver D, Aguilera A, García-Zarbate A, García-Riestra C, Regueiro BJ, 2001. Diarrea por adenovirus y astrovirus en pacientes inmunodeficientes hospitalizados. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, 19: 7-10.

Tompkins DS, Hudson MJ, Smith HR, Eglin RP, Wheeler JG, Brett MM, Owen RJ, Brazier JS, Cumberland P, King V, Cook PE, 1999. A study of infections intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls. ***Dis Public Health***, 2:108-13.

Walter JE, Mitchell DK, Guerrero ML, Berke T, Matson DO, Monroe SS, Pickering LK, Ruiz PG 2001. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico City. ***J Infect Dis***, 183: 681-686.

Walter JE, Mitchell DK, 2003. Astrovirus infection in children. ***Curr Opin Infect Dis***, 16: 247- 253.

Wei-xia Cheng, Yu Jin, Zhao-jun Duan, Zi-qian Xu, Hong-mei Qi, Qing Zhang, Jie-mei Yu, Lin Zhu, Miao Jin, Na Liu, Shu-xian Cui, Hui-ying Li, Zhao-yin Fang, 2008. Human Bocavirus in Children Hospitalized for Acute Gastroenteritis: A Case-Control Study. ***Clin Infect Dis***, 47:161–167

White L, Ball JM, Hardy ME, Tanaka TN, Kitamoto N, Estes MK, 1996. Attachment and entry of recombinant norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. ***J Virol***, 70 (10): 6589-97.

Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A, 2003. Viruses causing gastroenteritis. ***Clin Microbiol Infect***, 9: 247-262.

Willcocks MM, Carter MJ, Laidler FR, Madeley CR, 1990. Growth and characterization of human faecal astrovirus in a continuous cell line. ***Arch Virol***, 113: 73 -81.

World Health Organization. Report of the meeting on future direction for rotavirus vaccine research in developing countries. ***Geneva***, WHO; 2000.

Wyn-Jones AP, Pallin R, Dedoussis C, Shore J, Sellwood J, 2000. The detection of small round-structured viruses in water and environmental materials. ***J Virol Methods***, 87: 99-107.

Vainio K, Stene-Johansen K, Jonassen TO, Bruu AL, Grinde B, 2001. Molecular epidemiology of calicivirus infections in Norway. ***J Med Virol***, 65: 309-314.

Van R, Wun CC, Oryan ML, Matson DO, Jackson L, Pickering LK, 1992. Outbreaks of human enteric adenovirus, types 40 and 41 in Houston day care centers.

Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, et al. 1996. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. ***N Engl J Med***, 335:1022-8.

Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, et al. 2006. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. **N Engl J Med**, 354:23-33.

Xagorarakis I, Kuo DHW, DH, Wong KDH, Rose JMW, 2007. Occurrence of Human Adenoviruses at Two Recreational Beaches of the Great Lakes **Appl Environ Microbiol**; 73(24):7874–7881

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

Zheng MQ, Lin F, Zheng MY, Chen H, Zeng AP, Wu F, 2007. Clinical prospective study on maternal-fetal transmission of human bocavirus. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi**;21(4):331-3.

Yamashita T, Sakae K, Tsuzuki H, Suzuki Y, Ishikawa, Takeda N, Miyamura T, Yamasaki S, 1998. Complete nucleotide sequence and genetic organization of aichi virus, a distinct member of the Picomaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. **J Virol**, 72: 8408-8412.

Yamashita T, Ito M, Tsuzuki H, Sakae K, 2001. Identification of aichi virus infection by measurement of immunoglobulin responses in an enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Microbiol**, 39: 4178-4180.

Yu JM, Li DD, Xu ZQ, Cheng WX, Zhang Q, Li HY, Cui SX, Miao-Jin, Yang SH, Fang ZY, Duan ZJ, 2008. Human bocavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in China. **J Clin Virol**, 42(3):280-5.

Yuen KY, Woo PCY, Liang RHS, Chiu EK, Chen FF, Wong SS, Lau YL, Ha SY, Peiris JS, I Siau H, Chan TK, 1998. Clinical significance of alimentary tract microbes in bone marrow transplant recipients. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 30: 75-81.

## 10. ANEXOS

---

Senhora Gestante:

Existem algumas doenças que podem atingir a gestante que esteja com seu sistema de defesa comprometido, muitas vezes sem sintomas visíveis.

Algumas dessas doenças são viroses (causadas por Rotavírus, Adenovírus, Astrovírus e Calicivírus) que comprometem o intestino provocando diarréias, má digestão e fraqueza. Estas viroses são mais comuns de acometerem crianças com até dois anos de idade, provocando desidratações e muitos óbitos. Porém podem atingir a população adulta, sobretudo se estiverem com seu mecanismo de defesa contra infecção, debilitado.

Portanto, estamos propondo pesquisar a presença destes vírus em exames de fezes durante a gravidez e/ou após o parto, para verificar o quanto e o que eles representam para este grupo de gestantes. Embora não exista tratamento definido para estas doenças durante a gravidez, é conveniente acompanhar com atenção as portadoras destas viroses, observando se as mesmas irão apresentar diarréias ou outros sintomas e ainda orientar estas mães para aumentarem os cuidados para não transmitirem estes vírus aos seus recém-nascidos através de secreções digestivas.

Este estudo quer avaliar a frequência com que esta doença acomete este grupo de gestantes, deseja ajudar a ciência a combater este mal, produzindo vacinas específicas e quer apoiar o serviço de saúde na ajuda às mães atingidas por estas doenças.

Se você quiser participar desta pesquisa, será coletado, uma vez por mês, amostras de fezes para pesquisa destes vírus e ainda coleta de material fecal durante possíveis episódios de diarreia.

Você não terá nenhum gasto e o resultado lhe será entregue na próxima consulta, aqui mesmo neste serviço.

A sua participação será útil para você, seu bebê, sua família e para toda a sociedade. Se estiver de acordo, assine o documento que lhe é apresentado.

Rui Gilberto Ferreira

TERMO DE CONSENTIMENTO FIRMADO POR  
....., PARA  
PARTICIPAR DE INVESTIGAÇÃO TENDENTE A  
IDENTIFICAR A PRESENÇA E CARACTERIZAR O  
TIPO DE ROTAVÍRUS, ADENOVÍRUS,  
ASTROVÍRUS E CALICIVÍRUS EM AMOSTRAS  
FECAIS.

..... brasileira, maior de idade, ou representada legalmente por, declara seu consentimento para ser incluída na pesquisa que pretende identificar e caracterizar o tipo de Rotavírus, Adenovírus, Astrovírus e Calicivírus doenças que podem causar diarreias, desidratações e óbitos, principalmente em crianças e adultos com organismos apresentando sistemas de defesas contra infecções debilitados. Sua participação consiste em autorizar a pesquisa dos vírus em exames a ser realizados em amostras de suas fezes coletadas uma vez por mês ou durante períodos em que tiver diarreia, durante o ano de 2006.

Está devidamente informada de que não existem riscos inerentes aos procedimentos necessários para a realização do exame e que os resultados serão mantidos em sigilo e devolvidos à interessada através do nosso serviço de pré-natal.

Não lhe serão ministrados medicamentos e receberá as informações necessárias para prevenir eventuais consequências em relação à gravidez ou ao seu bebê. Ademais, poderá contar com o apoio do serviço para ações que se fizerem necessárias.

Por estarem de acordo, firmam o presente documento:

---

gestante

---

Rui Gilberto Ferreira  
Pesquisador



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
HOSPITAL DAS CLÍNICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 133/05

Goiânia, 30/03/2006

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Dr Rui Gilberto Ferreira

TÍTULO: "Detecção e caracterização genômica de rotavirus, adenovirus e calicivírus em gestantes em gestantes em Goiânia-Goiás".

Área Temática: Grupo III

Local de Realização: HC Depto. de Ginecologia

Patrocinador:

Senhor (a) Pesquisador (a),

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal, após a análise, aprovou \*com recomendação o projeto de Pesquisa acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

**\*Recomendamos: Que seja apresentado cronograma atualizado da pesquisa.**

→ Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

→ O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

**Prof. Joffre Rezende Filho**  
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

Data: \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_ DUM: \_\_ / \_\_ / \_\_\_\_ IG: \_\_\_\_ DPP: \_\_\_\_\_  
 Nome: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Telefone: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_  
 Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_  
 Idade: \_\_\_\_ Escolaridade: \_\_\_\_\_ Estado Civil: \_\_\_\_\_  
 Peso: \_\_\_\_ Kg Estatura: \_\_\_\_ m

G: \_\_ P: \_\_ A: \_\_ Nascidos Vivos: \_\_ Morreram: \_\_ Natimortos: \_\_\_\_\_

Exames Complementares  GS\_Frh  Coombs Indireto  Hemograma  
 EAS  VDRL  Rubeola  
 HIV  Toxoplasmose  Glicemia de jejum  
 Carga viral \_\_\_\_ / \_\_\_\_  Glicemia pós prandial  
 CD4/CD8 \_\_\_\_ / \_\_\_\_  TTG

Intercorrências: Gravidez / Parto / Puerperio  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Término da Gravidez  Aborto  P.Normal   cesária  
 Forceps

RN: \_\_\_\_\_ Condições de Vida: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

Complicações:  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Observações:  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura



# 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](#)