

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS EM CRIANÇAS COM
GASTROENTERITE AGUDA E IDOSOS INSTITUCIONALIZADOS EM
CAMPO GRANDE, MS.**

Tese de Doutorado

ORIENTADORA : Prof^ª. Dr^ª. Divina das Dores de Paula Cardoso

GOIÂNIA - GOIAS

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS EM CRIANÇAS COM
GASTROENTERITE AGUDA E IDOSOS INSTITUCIONALIZADOS EM
CAMPO GRANDE, MS.**

Tese de Doutorado apresentada pela pós-graduanda **MARCIA SUELI ASSIS ANDREASI** ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Rede Centro-Oeste, Convênio Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

ORIENTADORA : Prof^a. Dr^a. Divina das Dores de Paula Cardoso

GOIÂNIA - GOIAS

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Coordenadoria de Biblioteca Central – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

Andreasi, Márcia Sueli Assis.
A557d Detecção de vírus entéricos em crianças com gastroenterite
aguda e idosos institucionalizados em Campo Grande, MS / Márcia
Sueli Assis Andreasi. – Goiânia, 2008.

86 f. ; 30 cm.

Orientador: Divina das Dores de Paula Cardoso.
Tese (doutorado) – Convênio Rede Centro-Oeste: Universidade de Brasília,
Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

1. Gastroenterite. 2. Diarréia. 3. Viroses. I. Cardoso, Divina das Dores de Paula.
II. Título.

CDD (21) – 616.33

Dedico este trabalho

À minha família, meu alicerce, meu equilíbrio, que possibilitou com muita tranquilidade a finalização desta tese. Em especial, ao meu esposo, Wagner, pela compreensão, estímulo e paciência inesgotável. Existem pessoas que não agradecemos pelo que fizeram, mas sim por existirem.

Agradecimentos

A Deus, consolo para nossas vidas, força nas dificuldades, luz que ilumina nossos caminhos.

Aos meus pais, Belga e Maria, pelo exemplo de vida repleta de amor e respeito.

Aos meus filhos, Fábio, Thiago, Paula e André, pelo constante incentivo.

À minha orientadora, Prof^a Dra^a Divina das Dores de Paula Cardoso, pela dedicação, sabedoria, paz e tranquilidade transmitidas durante os seus ensinamentos neste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, que possibilitou a realização desta Pós-Graduação.

Aos colegas do laboratório de Virologia do IPTSP- UFG, Ana Maria, Fabíola, Rodrigo e Megmar, pela dedicação na realização dos testes moleculares.

À colega de disciplina de Microbiologia, Sonia Maria Fernandes, pelo afeto, estímulo e pela boa vontade em tudo que se dispôs a me ajudar.

Aos colegas de Pós-Graduação, pela oportunidade da convivência.

À administração da UFMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - pelo apoio dispensado.

Aos pais ou responsáveis das crianças e idosos, pela compreensão da proposta deste estudo como participantes da pesquisa.

À chefe do Departamento de Patologia, Inês Aparecida Tozetti, pelo carinho demonstrado.

À minha professora de inglês, Regina Vieira, pelo entusiasmo com que conduz os seus ensinamentos, tornado-os agradáveis e fáceis de assimilar.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 ASTROVÍRUS	4
2.1.1 Histórico	4
2.1.2 Classificação	5
2.1.3 Estruturas morfológica, genômica e protéica	5
2.1.4 Patogenia, sintomatologia e imunidade	6
2.1.5 Epidemiologia	10
2.1.6 Diagnóstico laboratorial	12
2.1.7 Prevenção e controle	14
2.2 CALICIVÍRUS	15
2.2.1 Histórico	15
2.2.2 Classificação	16
2.2.3 Estruturas morfológica, genômica e protéica.....	17
2.2.4 Patogenia, sintomatologia e imunidade	18
2.2.5 Epidemiologia	20
2.2.6 Diagnóstico laboratorial	22
2.2.7 Prevenção e controle	24

2.3	ADENOVÍRUS	25
2.3.1	Histórico	25
2.3.2	Classificação	26
2.3.3	Estruturas morfológica, genômica e protéica	27
2.3.4	Patogenia, sintomatologia e imunidade	29
2.3.5	Epidemiologia	32
2.3.6	Diagnóstico laboratorial	34
2.3.7	Prevenção e controle	35
2.4	ROTAVÍRUS	36
2.4.1	Histórico	36
2.4.2	Classificação	36
2.4.3	Estruturas morfológica, genômica e protéica	37
2.4.4	Patogenia, sintomatologia e imunidade	40
2.4.5	Epidemiologia	42
2.4.6	Diagnóstico laboratorial	44
2.4.7	Prevenção e controle	45
3	OBJETIVOS	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
5	ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO – <i>in press</i>	49
5.1	Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, MIOC-558-3128-13918-2-ED.DOC	49
6.0	ARTIGO SUBMETIDO.....	53

1	Occurrence of enteric virus in institutionalized older adults from Campo Grande-MS. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. Number 002369-8 2008.....	53
7	PERSPECTIVAS	63
8	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	APÊNDICES	82
	ANEXO	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CaCo-2 - Células de adenocarcinoma de cólon humano

cDNA - Cópia de ácido desoxirribonucleico complementar

CsCl - Cloreto de céσιο

DNA- *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DOU- Diário Oficial da União

dsRNA- *Double strand ribonucleic acid* (RNA fita dupla)

EGPA- Eletroforese em gel de poliacrilamida

EIE- Ensaio imunoenzimático

EIERA- Ensaio imunoenzimático combinado para rotavírus e adenovírus

FC- Fixação de complemento

G-C- Guanina-Citosina

HastVs- Astrovírus humano

HEK- Rim de embrião humano

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

HMA- Mobilidade heteroduplex

IAHA- Hemaglutinação por imunoaderência

ICTV- *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IF- Imunoflorescência

IH- Inibição da hemaglutinação

IME- Imunomicroscopia eletrônica

Kda- Quilodaltons

ME- Microscopia eletrônica

mRNA- RNA mensageiro

NASBA- *Nucleic Acid Sequence- Based Amplification*

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

NV- Norwalk vírus

PCR-Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia pela Polimerase

RIA- Radioimunoensaio

RLAs- Regiões de Leitura Aberta

RNA-Ácido ribonucléico

RT-PCR-Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction- Reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa

SN- Soroneutralização

SPIEM- Imunomicroscopia de fase sólida

ssRNA- Fita simples de ácido ribonucléico

SV- Sapovírus

TP- *Terminal Protein* (Proteína terminal)

UFG- Universidade Federal de Goiás

UFMS- Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

VORH - Vacina oral para rotavírus humano

VP- Proteína viral

RESUMO

Os vírus entéricos ocupam papel de destaque na etiologia das gastroenterites virais como importante causa das diarreias infantis no mundo. Uma ampla diversidade de agentes etiológicos virais tem implicações na epidemiologia das diarreias agudas. A detecção dos vírus entéricos em idosos tem sido valorizada em função da possibilidade de epidemias, bem como da preocupação da saúde pública com a qualidade de vida dessa população, uma vez que os avanços tecnológicos têm contribuído para elevar a expectativa de vida. O papel dos vírus entéricos nas gastroenterites infantis agudas no Brasil está bem estabelecido através de diferentes estudos, entretanto poucos dados estão disponíveis sobre a ocorrência desses vírus na população de adultos. Visando contribuir para essa questão, este estudo definiu a etiologia da gastroenterite viral em crianças hospitalizadas e idosos institucionalizados na cidade de Campo-Grande, MS. A detecção de astrovírus e calicivírus foi realizada pela metodologia da reação em cadeia pela polimerase (PCR) e a detecção de adenovírus e rotavírus pelo ensaio imunoenzimático combinado para rotavírus e adenovírus (EIERA). A amostra do estudo constitui-se de fezes de crianças com até 3 anos de idade internadas na Santa Casa e no Hospital Universitário de Campo-Grande/MS, bem como de fezes de idosos institucionalizados no asilo São João Bosco. Nas crianças estudadas, foi observada ocorrência de 3,1% para astrovírus, 7,6% para calicivírus e 3,6% para adenovírus. Das 115 amostras estudadas dos idosos institucionalizados, 13 (11,3%) foram positivas para os vírus pesquisados. Não ocorreu detecção de Rotavírus do grupo A, e o percentual observado para astrovírus, calicivírus, adenovírus foi de 0,8%, 8,7% e

1,7%, respectivamente. Os dados obtidos neste estudo reforçam a importância de constante monitoramento das infecções entéricas na população infantil, bem como também evidenciam a circulação desses agentes virais na população de idosos institucionalizados em Campo Grande, MS. Tais comprovações constituem importante instrumento para avaliação dos resultados obtidos com a vacina para Rotavírus A, presente desde 2006 no Calendário Nacional de Imunização.

Palavras-chave: gastroenterite, diarreia, rotavírus, calicivírus, astrovírus, adenovírus

ABSTRACT

Enteric viruses play a major role in the etiology of viral gastroenteritis as an important cause of infantile diarrhea in the world. A wide range of etiological agents has implications in the epidemiology of acute diarrheas. The detection of enteric viruses among the elderly has been enhanced due to the possibility of outbreaks, and also because of the Public Health concern about the quality of life of this population, as technological progress has contributed to an increase in life expectancy. The role of enteric viruses in acute infantile gastroenteritis in Brazil has been well defined through different studies. However, few data about the occurrence of these viruses in the adult population are available. In order to contribute to this issue, this study defined the etiology of viral gastroenteritis in hospitalized children and institutionalized elderly in Campo Grande/MS. Astrovirus and calicivirus have been detected by Polymerase Chain Reaction (PCR) and adenovirus and rotavirus by a combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). This study comprised the analyses of stool samples of children under 3 years of age admitted to Santa Casa and University Hospital in Campo Grande/MS, and elderly people institutionalized at Asilo São João Bosco. Among the children, astrovirus (3,1%), calicivirus (7,6%) and adenovirus (3,6%) have been observed. Among the 115 elderly people samples, 13 (11,3%) were positive for the viruses at issue. Group A rotavirus was undetected in the elderly population and astrovirus, calicivirus and adenovirus accounted for 0,8%, 1,7% and 8,7%, respectively. The results of this study reinforce the importance of a constant surveillance of enteric infections in child population and also show the circulation of these viral agents among the elderly

population institutionalized in Campo Grande, MS. Such findings constitute an important tool to evaluate the results of the vaccine against Rotavirus A, used since 2006 in the National Immunization Program (Calendário Nacional de Imunização) in Brazil.

Key-words: gastroenteritis, diarrhea, rotavirus, calicivirus, astrovirus, adenovirus

1- INTRODUÇÃO

A gastroenterite aguda é geralmente causada por um agente de natureza infecciosa que coloniza a mucosa intestinal e desencadeia disfunção na absorção de água, eletrólitos e nutrientes. O resultado pode ser desidratação severa e evolução para morte (TOPOROVSIKI et al., 1999). Mais de 20 tipos diferentes de vírus são reconhecidos como importantes causas da doença diarréica aguda no mundo, o que provoca um grande impacto na população, particularmente crianças (OKITSU-NEGISHI et al., 2004). A gastroenterite aguda é doença freqüente em crianças de até cinco anos de idade, sendo uma das principais causas de hospitalização, com elevados índices de mortalidade em países em desenvolvimento (OH et al., 2003). O papel dos vírus entéricos no processo da gastroenterite infantil no Brasil está bem estabelecido através de diferentes estudos realizados (SANTOS et al., 2003; ORLANDI et al., 2006; GABBAY et al., 2007; VICTORIA et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2007). Na região Centro-Oeste, vários estudos têm sido conduzidos visando à detecção de agentes virais como *Rotavírus A*, adenovírus entéricos, calicivírus e astrovírus (CARDOSO et al., 2000; 2001; 2003; COSTA et al., 2004 ;BORGES et al., 2006; ANDREASI et al., 2007). No entanto, ainda são escassos os estudos relativos à ocorrência, sintomática ou não, desses vírus na população adulta e principalmente em idosos (ANDERSON; WEBER, 2004). Para a saúde humana, é importante a vigilância epidemiológica da gastroenterite com a definição do agente etiológico, pois contribui para a elaboração de medidas que visam à melhoria das condições de saneamento da população (CASO et al., 1996).

Antes da descoberta dos vírus como agentes causadores de diarréia, a etiologia dessa doença era identificada somente em uma proporção muito limitada de

indivíduos com gastroenterite. Subseqüentemente, com a descoberta do Norwalk vírus, rotavírus, astrovírus e adenovírus entéricos, foi possível a associação desses agentes virais como causadores de infecções entéricas (LEBARON et al., 1990). Os principais vírus isolados de quadros diarréicos foram *Rotavírus A*, adenovírus entéricos, calicivírus e astrovírus (WILHELMI et al., 2003).

Os astrovírus têm sido identificados como importantes agentes de gastroenterite em crianças e idosos, estando associado a epidemias de gastroenterites em adultos jovens que incluem recrutas militares, estudantes e professores, podendo ocorrer também em crianças imunocomprometidas (GALLIMORE et al., 2005).

Calicivírus são gêneros pertencentes à família *Caliciviridae*, que comportam vírus causadores de gastroenterite em humanos. Já foram relatados casos esporádicos e epidemias em crianças de diferentes localizações geográficas, além de surtos em idosos institucionalizados e adultos que participavam de cruzeiro (FARKAS et al., 2004).

Os adenovírus humanos foram identificados a partir dos anos de 1950 e têm sido extensivamente estudados em termos de etiologia de doenças bem como de aspectos de terapia gênica (GINSBERG, 1999; VELLINGA et al., 2005). Esses vírus são amplamente distribuídos no mundo e estão relacionados com uma variedade de enfermidades que inclui doenças respiratórias, conjuntivite, uretrite e gastroenterites (SWENSON et al., 1995; CURTIS et al., 1998; WOLD; HORWITZ, 2007). Os adenovírus relacionados com a gastroenterite acometem principalmente crianças com idade inferior a dois anos, mas também afetam indivíduos imunocomprometidos de qualquer faixa etária, nos quais a infecção pode levar à morte (MUNOZ et al., 1998; WILHELMI et al., 2003).

Os *Rotavírus A* são os agentes etiológicos de gastroenterite mais amplamente estudados, portanto, os mais bem caracterizados. São predominantes na natureza e estão associados à gastroenterite no homem e em diversas espécies de animais. Essa espécie vem sendo considerada, em todo o mundo, o agente etiológico mais comum de diarreia em bebês e crianças menores de 3 anos. No entanto o papel desse patógeno na infecção em adultos não está totalmente esclarecido (ANDERSON; WEBER, 2004).

Considerando que não existem informações referentes à circulação de vírus entéricos na população de Campo Grande (MS), e que é necessário o preenchimento dessa lacuna, o presente trabalho investigou a etiologia viral da gastroenterite aguda em crianças hospitalizadas e em idosos institucionalizados em Campo Grande-MS. Os resultados obtidos fornecerão subsídios para o conhecimento dos vírus circulantes em nossa região; para a implementação de programas de prevenção contra a gastroenterite aguda; e para a avaliação da vacinação contra o *Rotavírus A*, o que contribuirá substancialmente para a melhoria da saúde pública na região.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- ASTROVÍRUS

2.1.1- Histórico

A primeira evidência da associação de astrovírus com episódios de gastroenterite aguda foi relatada por Appleton & Higgins em 1975, a partir de um surto de diarreia e vômito entre crianças em uma maternidade do sul da Inglaterra. No mesmo ano, Madeley & Cosgrove (1975a) caracterizaram o agente por meio de ME, na qual foram visualizadas partículas virais que apresentavam projeções em suas superfícies semelhantes a uma estrela de cinco a seis pontas. Desde então, os astrovírus têm sido reconhecidos como agente etiológico de diarreia em crianças, assim como em animais (carneiro, bezerro, veado, gato, cachorro, pássaros e aves) (HERRMANN et al., 1991; MENDEZ; ARIAS, 2007; SHIMIZU M et al., 1990). Lee & Kurtz, em 1981, reportaram o isolamento de astrovírus em cultura de células primárias. No Brasil, a primeira detecção desses vírus ocorreu a partir de fezes diarreicas de uma criança que também excretava rotavírus (NOZAWA et al., 1985).

Em 1984, foram reconhecidos cinco sorotipos de astrovírus pelo uso da técnica de imunofluorescência (BELLIOT, et al., 1997a). 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 de agentes virais, como a (RT-PCR) e o seqüenciamento genômico (MENDEZ; ARIAS, 2007; MITCHELL, 2002; WALTER; MITCHELL, 2003). Essas novas metodologias possibilitaram o conhecimento e a comparação das seqüências nucleotídicas dos genomas entre os tipos de astrovírus humanos e animais conhecidos, permitindo a

identificação de novos sorotipos de astrovírus (LEWIS et al., 1994; WILLCOCKS et al., 1994; JIANG et al., 1993; OH; SCHREIER, 2001; MENDEZ-TOSS et al., 2000).

2.1.2- Classificação

Os astrovírus pertencem à família *Astroviridae*, que é dividida em dois gêneros: *Mamastrovirus* e *Avastrovirus*. O gênero *Mamastrovirus* infecta mamíferos incluindo o homem e é constituído de, pelo menos, 8 sorotipos de astrovírus diferentes. O gênero *Avastrovirus* inclui vírus isolados de espécies aviárias como patos, perus e galinhas (LUKASHOV; GOUDSMIT, 2002; WALTER; MITCHELL, 2003; MENDEZ; ARIAS, 2007).

2.1.3- Estruturas morfológica, genômica e protéica

Os astrovírus são vírus esféricos, pequenos, com uma morfologia peculiar, apresentando de 28nm a 40nm. À ME, apresentam-se como estrela de cinco a seis pontas, embora grande número de partículas não apresente essa característica (MADELEY; COSGROVE, 1975a).

São vírus não envelopados, possuem capsídeo icosaédrico formado por três tipos de proteínas 22kDa a 35kDa (BASS; QIU, 2000; BASS; UPADHYAYLA, 1997; MENDEZ; ARIAS, 2007). Os astrovírus possuem genoma de RNA de fita simples, polaridade positiva com aproximadamente 6800 nucleotídeos, sendo poliadelinado na sua extremidade 3' (GRENBERG; MATSUI, 1992). Sua organização genômica inclui três regiões de leitura aberta (RLAs): RLA1a, RLA1b RLA2, cada uma codificando para, pelo menos, uma poliproteína viral (MENDEZ; ARIAS, 2007).

As extremidades 5' e 3' do genoma viral constituem duas regiões não codificantes com cerca de 80 nucleotídeos cada uma, sendo que a primeira antecede a RLA1a e a outra intercala a RLA2 e a cauda polidenilada (AAA_n) (MENDEZ; ARIAS, 2007). As regiões RLA1a e RLA1b, próximas da extremidade 5' do genoma, são responsáveis pela codificação de uma poliproteína não estrutural denominada NSP1ab, de 160 kDa, a qual é clivada em duas proteínas: NSP1a (103 kDa), que exibe uma sequência codificante para a serina protease viral; e outra de 57kDa, que apresenta motivos de uma RNA polimerase RNA dependente (MENDEZ et al., 2003).

Durante o processo de replicação e biossíntese viral no interior da célula hospedeira, há a produção de um RNA subgenômico pela RLA2, o qual está envolvido na produção das proteínas virais estruturais (MONROE et al., 1993; LEWIS et al., 1994; MENDEZ; ARIAS, 2007). Essa região codifica um produto primário, precursor do capsídeo viral de aproximadamente 90 kDa, que é clivado para produzir uma proteína de 70kDa montada dentro da partícula viral. Na presença de tripsina, esta forma pelo menos três polipeptídeos menores com massas de 26 a 34kDa (MONROE et al., 1991; SANCHEZ FAUCHIER et al., 1994; BELLLOT et al., 1997a; BASS; QIU, 2000; MENDEZ et al., 2002).

2.1.4- Patogenia, sintomatologia e imunidade

Os astrovírus são transmitidos através da rota fecal-oral, como demonstrado em estudos com voluntários humanos (KURTZ et al., 1979). Pode ser transmitido também a partir de contatos íntimos com pessoas infectadas pelos vírus, por água e alimentos contaminados e provavelmente por fômites. (SANTOS, 2002; ABAD et al., 2001). Uma vez verificada a transmissão de astrovírus por água e

alimentos contaminados, deve ser considerada a possibilidade de haver várias fontes de infecção, tais como água destinada para o consumo, água de piscinas e rios, água de esgotos contendo resíduos humanos, barragens, água para tratamento de plantas e alimentos marinhos (ostras e moluscos) (WALTER; MITCHELL, 2003; MAUNULA et al., 2004; TAYLOR et al., 2001). Até o momento, pouco se sabe a respeito da patogenia dos astrovírus, ou quais fatores do hospedeiro estão envolvidos na liberação viral e na resolução da doença (KOCI et al., 2003). Relatos de casos de diarreia em crianças relacionados com astrovírus sugerem que a replicação viral ocorre em células epiteliais intestinais. Foi também observada presença de partículas virais no epitélio de biópsia duodenal e em macrófagos da lâmina própria de indivíduos com infecção sintomática (MITCHELL, 2002). Estudos realizados em animais mostram agregados de partículas virais dentro dos lisossomos celulares, vacúolos autofágicos, macrófagos e enterócitos, contendo partículas virais que também apresentam degeneração e conseqüente morte celular, com atrofia das vilosidades intestinais e hipertrofia das criptas (SANTOS, 2002). A infecção parece ser restrita às vilosidades dos enterócitos e ao epitélio exposto. A replicação dos astrovírus ocorre no citoplasma das células hospedeiras, sendo que a adesão parece ocorrer em receptores que apresentam ácido siálico. Admite-se que a penetração das partículas virais nas células seja realizada 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 gênomico viral de polaridade positiva, a RNA polimerase produz uma cópia de RNA antígenômico de polaridade negativa, o qual atua como intermediário para a síntese final dos dois tipos de RNA (gênomico e subgênomico), (MONROE et al., 1993; LEWIS et al., 1994; MATSUI et al., 2001). Admite-se, ainda, que o RNA subgênomico produzido

em grande quantidade e acumulado dentro do citoplasma celular direciona a síntese das proteínas estruturais (MENDEZ; ARIAS, 2007; SANTOS, 2002). Além disso, postula-se que a região genômica que apresenta um alto grau de variabilidade da proteína NSP1a esteja envolvida na replicação do RNA viral (GUIX et al., 2005).

Embora o mecanismo não seja ainda bem conhecido, admite-se a ocorrência de apoptose celular durante o processo de replicação dos astrovírus. Um estudo realizado por GUIX et al., 2004, empregando a linhagem celular CaCo-2, mostrou que as células infectadas por astrovírus tipo 4 apresentavam aspectos morfológicos e bioquímicos tais como condensação da cromatina celular, ativação de endonucleases celulares, fragmentação de DNA celular e formação de corpos apoptóticos, indicando sinais de resposta apoptótica celular frente à infecção pela cepa viral. Além disso, foi considerado que uma família de cisteína protease, a caspase 8, pode desempenhar uma função importante na resposta apoptótica durante o processo de infecção viral. Isso levaria a uma redução da infectividade da progênie viral e, ainda, teria uma relação entre a indução de apoptose celular e das proteínas codificadas pela RLA1a (MENDEZ; ARIAS, 2007).

O período de incubação varia de um a quatro dias, podendo ser de 24-36 horas em surtos de gastroenterite aguda e nos casos secundários (MITCHELL, 2002). A infecção pelos astrovírus provoca uma diarreia aguda moderada (fezes líquidas) que dura de dois a três dias, tende a ser leve e autolimitante, e geralmente não resulta em hospitalização. Além disso, outros sintomas podem estar associados, como vômito, febre, anorexia e dor abdominal, que podem durar em média quatro dias (WALTER; MITCHELL, 2003; MENDEZ; ARIAS, 2007; GUIX et al., 2002). A complicação mais severa, embora pouco comum, é a desidratação, que pode estar

associada ou não ao baixo estado nutricional, ou à infecção mista ou à imunodeficiência (MENDEZ; ARIAS, 2007).

Os astrovírus acometem principalmente crianças menores de cinco anos de idade; entretanto podem afetar crianças maiores que apresentam concomitantemente dor de cabeça, febre e náuseas. Os adultos normalmente possuem anticorpos, porém a imunidade se mostra apenas parcial, sendo que uma diarreia moderada pode ser induzida em voluntários (KURTZ et al., 1979; COOK; MYINT, 1995). Pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e indivíduos idosos parecem ser mais susceptíveis a desenvolver uma infecção sintomática (GIORDANO et al., 1999; GALLIMORE et al., 2005). Acredita-se que os HastVs também participem de quadros de gastroenterites em indivíduos que sofreram transplante de medula óssea (COX et al., 1994; CUBITT et al., 1999).

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

Infecção nosocomial por HastVs tem sido observada, e sua prevalência e transmissibilidade podem estar relacionadas com os pacientes assintomáticos que eliminam os HastVs nas fezes, como também com contaminação ambiental devido à relativa resistência desses vírus aos desinfetantes frequentemente utilizados (FORD-JONES et al., 1990; RODRIGUEZ-BAEZ et al., 2002; MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

Em geral, a gravidade das infecções por astrovírus é menor em relação aos demais vírus entéricos; mortes associadas à infecção por HastVs são extremamente raras, mas já foram relatadas (SINGH et al., 1989).

Ainda não são bem conhecidos os reais mecanismos de imunidade nas infecções pelos astrovírus. Considerando as diversas epidemias estudadas até o presente, acredita-se que haja uma maior suscetibilidade entre as crianças e os idosos. Sugere-se que adultos jovens possuem anticorpos protetores que provavelmente conferem resistência à reinfecção, mas acredita-se que esses anticorpos declinem progressivamente com o tempo (WILHELMI et al., 2003).

2.1.5- Epidemiologia

Tanto em âmbito hospitalar como ambulatorial, estudos confirmam os astrovírus como enteropatógenos de distribuição global (BERECIARTU et al., 2002; CUNLIFFE et al., 2002; MENDEZ; ARIAS, 2007). Em geral, o índice de prevalência no âmbito hospitalar varia de 2 a 16% e, na comunidade, de 5 a 17% (PALOMBO; BISHOP, 1996; MENDEZ-TOSS et al., 2004). Casos de diarreia associada à infecção por astrovírus humanos já foram relatados em surtos ocorridos em creches, jardins de infância e escolas (MITCHELI et al., 1999; SILVA et al., 2001), em asilos e entre militares (GRAY et al., 1987; BELLLOT et al., 1997b; MARSHALL et al., 2007). Surtos relacionados com o consumo de água e alimentos contaminados também foram descritos (OISHI et al., 1994; TAYLOR et al., 2001). Como referido, os astrovírus acometem principalmente, mas não exclusivamente, crianças. Casos esporádicos de epidemias têm sido relatados em pacientes mais velhos, recrutas militares (BELLLOT G, 1997b) e adultos imunocomprometidos geralmente hospitalizados (CUBITT et al., 1999; GALLIMORE et al., 2005; COX et al., 1994; TREVINO et al., 2001; SEBIRE et al., 2004).

A incidência dos HastVs nos quadros de gastroenterite aguda foi registrada a partir de diversos estudos conduzidos em países asiáticos e na Oceânia (4% a 11%)

(SCHNAGL et al., 2002), África (2% a 9%) (CUNLIFFE et al., 2002), Continente Europeu (3% a 7%) (OH et al., 2003), América Latina (4% a 17%) (ESPUL et al., 2004) e Estados Unidos (3% a 10%) (DENNO et al., 2005).

No Brasil, a maioria dos estudos sobre astrovírus tem sido conduzida em hospitais públicos. Pesquisas realizadas no Rio de Janeiro, São Paulo e Recife detectaram esses vírus através de ME em espécimes fecais de crianças portadoras de quadro diarréico agudo (LEITE et al., 1991; STEWIEN et al., 1991; TIMENETSKY et al., 1993). No sudeste do país, e em Goiás, os astrovírus humanos foram responsabilizados por surtos de gastroenterites intrafamiliar e em creche, sendo caracterizados como tipo 1 por realização do sequenciamento gênomico (TANAKA et al., 1994; SILVA et al., 2001; Santos et al., 2007). O padrão de sazonalidade das infecções por HastVs ainda é um tema controverso, parecendo variar de acordo com a região geográfica analisada (WALTER; MITCHELL, 2003; MENDEZ; ARIAS, 2007).

A frequência de detecção dos diferentes tipos de astrovírus varia de acordo com o tempo e a região geográfica. No contexto, tem sido observada maior ocorrência do tipo 1, seguido pelo 2, 3, 4 e 5 (LEE; KURTZ, 1994; GLASS et al., 1996; MUSTAFA et al., 2000; SAKAMOTO et al., 2000), com menor detecção dos sorotipos 6, 7 e 8 (CHIKHI BRACHET et al., 2002; WALTER; MITCHELL, 2003; CUNLIFE et al., 2002; GUIX et al., 2002; MENDEZ et al., 2002; VICTORIA et al., 2007). As pesquisas realizadas no Brasil demonstram um padrão similar, com predominância do tipo 1 (SILVA et al., 2001; CARDOSO et al., 2002; SILVA et al., 2006; VICTORIA et al., 2007).

2.1.6- Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é baseado na detecção de partículas virais ou do genoma viral em espécimes clínicos (fezes, swabs retais). As várias metodologias empregadas na detecção e caracterização desses vírus são: ME e imunomicroscopia eletrônica (IME), ensaio imunoenzimático (EIE), aglutinação em látex, crescimento viral empregando culturas celulares, bem como procedimentos moleculares. Entretanto todas as técnicas têm vantagens e desvantagens (MENDEZ; ARIAS, 2007; SANTOS, 2002; MITCHELL, 2002; TAI et al., 2003; WALTER; MITCHELL, 2003; WILHELMI et al., 2003).

A detecção de partículas virais de astrovírus em espécimes fecais empregando-se as técnicas de ME ou imunomicroscopia eletrônica (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, 1975a; MENDEZ; ARIAS, 2007; RÁCZ, 2008).

Os testes EIEs são mais sensíveis e específicos quando comparados com as técnicas de ME e IME e, atualmente, “kits” que utilizam anticorpos monoclonais grupo-reativos para capturarem antígenos virais estão comercialmente disponíveis (GLASS et al., 1996; MATSUI; GREENBERG, 2000; MITCHELL, 2002).

Os testes de aglutinação em látex são considerados procedimentos simples, rápidos, menos dispendiosos, com boa especificidade, permitindo a análise de grande número de amostras, embora menos sensíveis que o EIE (KOMORIYA et al., 2003).

São utilizadas técnicas moleculares como a reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR), hibridização (*dot-blot*, *Northern blotting* e ensaio de hibridização líquida), NASBA (amplificação baseada em

seqüência de ácido nucléico), bem como o sequenciamento gênomico. 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 trabalhosos e demorados. A técnica de NASBA para detecção de astrovírus, demonstrou que essa metodologia apresenta índices semelhantes ou de maior sensibilidade quando comparada com a RT-PCR. Contudo, os produtos derivados da NASBA podem ser instáveis e difíceis de serem trabalhados. Além desses aspectos, nessa técnica há a possibilidade de ocorrência de interações inespecíficas, além de inibidores nas amostras submetidas à análise (TAI et al., 2003).

A RT-PCR é uma metodologia que permite a detecção de qualquer das 3 regiões do genoma, a partir da utilização de oligonucleotídeos específicos (BELLIOT et al., 1997a). 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; SCHNAGL et al., 2002; OH et al., 2003). 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 e, principalmente, para a região RLA2 (SAKAMOTO et al., 2000; OH; SCHREIR, 2001; JAKAB et al., 2003).

O sequenciamento genômico permite, além da genotipagem, a detecção de variações nucleotídicas obtidas por seqüências parciais ou completas no genoma

desses vírus, o que tem como vantagem a possibilidade da compreensão do processo evolutivo das amostras de astrovírus humanos e de animais (MENDEZ-TOSS et al., 2000; OH; SCHREIER, 2001; LUKASHOV; GOUDSMIT, 2002; JAKAB et al., 2003; ESPUL et al., 2004).

O cultivo de astrovírus em linhagens celulares é também uma metodologia que proporciona o isolamento e a identificação viral. Várias linhagens podem ser utilizadas, como 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., 1994; SILVA et al., 2001; SANTOS, 2002).

Atualmente, uma combinação de cultivo celular e RT-PCR constitui uma nova metodologia empregada, denominada ICC/RT-PCR (reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa integrada ao cultivo celular), que vem sendo utilizada tanto para amostras humanas quanto do meio ambiente, aumentando a sensibilidade da RT-PCR e do isolamento viral (GRIMM et al., 2004, MUSTAFA et al., 1998).

2.1.7- Prevenção, controle e tratamento

Não existe até o momento uma terapia antiviral ou mesmo uma vacina disponível para os HastVs. O tratamento visa prevenir ou tratar uma possível desidratação causada por vômito e diarreia, a partir da reposição hidrolítica via oral ou intravenosa (KURTZ; LEE, 1987; CRUZ et al., 1992). A administração de gamaglobulina humana hiperimune com altos títulos de IgG anti HastV-1, em crianças submetidas a transplante de medula óssea infectadas por esse sorotipo de vírus, não impediu a replicação viral (CUBITT et al., 1999).

As medidas que visam controlar e prevenir epidemias de gastroenterites virais associadas ao astrovírus devem promover a interrupção da transmissão do agente. Tais medidas, que visam a minimização das fontes de infecção, incluem o controle de indivíduos doentes que sejam manipuladores de alimentos, o impedimento da contaminação de suprimento de água, além da interrupção de contatos íntimos com pessoas infectadas (WALTER; MICHELL, 2003). Em hospitais e creches devem ser reforçados os procedimentos de higiene pessoal (MENDEZ; ARIAS, 2007). Para prevenir infecções nosocomiais, as crianças que apresentam quadro diarréico severos devem ser isoladas (MITCHELL, 2002).

2.2- CALICIVÍRUS

2.2.1- Histórico

Estudos realizados nos Estados Unidos com voluntários utilizando filtrados de amostras de fezes coletadas em surtos de gastroenterite nas décadas de 40 e 50 mostraram que 75% dos casos não estavam associados a bactérias ou parasitas, o que levou à sugestão de que os vírus eram os agentes etiológicos responsáveis pela infecção (GREEN, 2007).

Um grande avanço relativo à definição da etiologia das gastroenterites virais ocorreu em 1972 com a descoberta do “Norwalk virus” (NV) por Kapikian et al, (1972) com a utilização da imunoeletromicroscopia (IME). A denominação NV vírus deveu-se ao nome da cidade dos Estados Unidos onde ocorreu o surto de diarreia acometendo alunos e professores de uma escola primária em que o NV foi detectado pela primeira vez. Por microscopia eletrônica, o NV apresentou-se como uma estrutura arredondada, com diâmetro de 27 a 40 nm. Em 1977, na cidade de Sapporo, Japão, foi observado, também por IME, partículas morfológicamente semelhantes ao

NV, que foi denominado “Sapporo virus”(SV) (NAKATA et al., 1996). Posteriormente foi demonstrado que os NV e os SV eram antigenicamente distintos (CHIBA et al., 1979).

2.2.2- Classificação

Os calicivírus pertencem à família *Caliciviridae*, são espécies protótipos dos gêneros *Norovirus* e *Sapovirus*, que infectam humanos. A família apresenta ainda dois outros gêneros, *Vesivirus* e *Lagovirus*, que infectam outros animais (GREEN, 2007). Pela análise filogenética, todos os calicivírus apresentam um ancestral comum, com grupos genômicos distintos dentro dos gêneros da família, considerando, sobretudo, características de organização do RNA genômico (GREEN, 2007). O gênero norovírus é composto de quatro genogrupos: I, II, III e IV. O genogrupo I, por sua vez, é composto de cinco grupos genéticos; o II, de nove grupos genéticos; e o III, de um único grupo genético (ANDO et al., 1995). O genogrupo IV comporta, além do NV, os isolados Desert Shield vírus, Lordsdale vírus, México vírus, Hawaii vírus, Snow Mountain vírus e Southampton vírus (ANDO et al .,2000).

Baseados na análise filogenética de seqüências da região do capsídio, os SV são classificados em cinco genogrupos e nove grupos genéticos. O genogrupo I comporta, além do SV, os isolados Houston/86, Plymouth/92, Manchester/93, Lyon 30388/98, Parkville/94, Stockholm/97 e México/14917. O genogrupo II comporta as amostras London/92, Lyon 598/97, Bristol/98, México 340/90 e Crusie ship/00 (FARKAS et al., 2004).

2.2.3- Estruturas morfológica, genômica e protéica

Os calicivírus são vírus pequenos, com 27 a 40nm de diâmetro, possuem capsídio de simetria icosaédrica e não apresentam envelope com densidade de sedimentação em CsCl de 1,33 a 1,44g/cm³. Os calicivírus possuem genoma de RNA linear de fita simples, polaridade positiva, variando de 7,3 a 8,3 Kb. O genoma apresenta a extremidade 5' associada a uma pequena proteína VPg e uma cauda poliadenilada na região 3'. Os vírus dos gêneros *Norovírus* e *Vesivírus* apresentam o genoma organizado em três regiões de leitura aberta (RLA1, RLA2 e RLA3). A RLA1 codifica para uma poliproteína que, por clivagem, origina três proteínas não estruturais, 2C, 3C e 3D, as quais contêm motivos para helicase, cisteína protease e RNA polimerase RNA-dependente, respectivamente. A RLA2 codifica para a proteína principal do capsídio, VP1 (58 a 80 kDa); e a RLA3, considerada a região mais variável do genoma, codifica para uma pequena proteína estrutural, VP2 (10 a 30 kDa), que, possivelmente, possui função de encapsidação do RNA viral (ATMAR; ESTES 2001, CHEN et al., 2006).

O genoma dos *Sapovírus* e *Lagovírus* é organizado em apenas duas regiões de leitura aberta (RLA1 e RLA2). A RLA1 codifica a poliproteína não estrutural e a proteína principal do capsídio, VP1; e a RLA2, a VP2, uma pequena proteína de função não conhecida (GREEN, 2007).

O capsídio é composto principalmente por uma proteína, VP1, a qual se forma por 180 moléculas organizadas em 90 dímeros, que formam dois domínios, S e P. O domínio S forma a parte interna do capsídio que envolve o genoma viral. O domínio P, subdividido em domínios P1 e P2, apresenta-se pela ME com uma arquitetura característica, depressões que lembram um cálice (mais aparente nos *Sapovírus*) que confere à partícula viral uma aparência de “Estrela de Davi”. Além

disso, outro tipo de proteína, VP2, é também observada com uma a duas cópias por vírus (ATMAR; ESTES, 2001; GREEN, 2007).

2.2.4- Patogenia, sintomatologia e imunidade

Admite-se que, em humanos, a forma mais comum de infecção por calicivírus seja pela ingestão de água e alimentos contaminados embora, como referido, ela também possa ocorrer mediante o contato pessoal ou por aerossóis produzidos durante o vômito (KOOPMANS et al., 2002; SAIR et al., 2002.) Esses vírus são considerados resistentes ao pH ácido do estômago, uma vez que eles permanecem infecciosos após a sua passagem (DOLIN et al., 1972).

O sítio primário de replicação dos calicivírus no homem não é bem conhecido, mas admite-se ser a porção jejunal do intestino delgado, pois nessa região anatômica ocorrem desorganização das células epiteliais, achatamento das vilosidades intestinais, vacuolização do citoplasma e infiltração de polimorfonucleares e mononucleares na lâmina própria, mesmo com a mucosa permanecendo intacta (DOLIN et al., 1975). Estudo clínico demonstrou que a atividade enzimática no intestino delgado é reduzida (fosfatase alcalina, sacarase e trealase), resultando em esteatorréia branda e má absorção transitória de carboidratos. A mobilidade gástrica é reduzida, o que pode ser responsável por náuseas e vômito associados à diarreia (MEEROFF et al., 1980).

O período de incubação do vírus varia de 24 a 48 horas, o que se segue geralmente ao estabelecimento abrupto do quadro de vômito ou diarreia, ou ambos. Embora esses sintomas sejam vistos em todas as faixas etárias, o vômito é mais frequente em crianças e a diarreia em adultos. Além do vômito e diarreia, outros sintomas, como náusea, mal estar, dor abdominal, febre e calafrios, são

também comuns. Na maioria dos casos, a diarreia é aquosa, sem muco, sangue ou leucócitos (PARRINO et al., 1977; CUBITT et al., 1979; MEEROFF et al., 1980; CHRIS, 2003).

Admite-se que os vírus do gênero *Norovirus* levam mais frequentemente à gastroenterite grave, enquanto os *Sapovirus* são geralmente associados à doença mais branda (PANG et al., 2000). A hospitalização por desidratação severa é rara, porém já foram relatados casos de fatalidade em pacientes debilitados e imunocomprometidos. No entanto, em geral, a doença é branda e autolimitada, sendo que a duração dos sintomas é de 12 a 60 horas (KAPLAN et al., 1982).

O diagnóstico clínico provisório da infecção durante os surtos é possível através da análise dos seguintes parâmetros: (1) ausência de bactérias e parasitas, (2) vômito em mais de 50% dos casos (3) duração da doença, e (4) período de incubação. Para um diagnóstico definitivo há necessidade de métodos de detecção de antígenos ou do genoma viral.

Os vírus são excretados nas fezes em baixas concentrações, sendo a dose infecciosa de 10-100 vírions. A excreção tem início 15 horas após a infecção com pico entre 25 e 72 horas (KAPLAN et al., 1982; PARASHAR et al., 1998).

A imunidade para calicivírus em humanos é ainda pouco conhecida (MATSUI; GREENBERG, 2000) e as informações existentes são decorrentes de estudos com voluntários. Adultos demonstram alto grau de susceptibilidade para doença naturalmente adquirida ou experimentalmente induzida. Em algumas epidemias de norovírus, mais de 80% dos adultos tornaram-se doentes e, sob condições experimentais, aproximadamente 50% dos adultos voluntários infectados com NV desenvolveram a doença. Esse estudo estabeleceu duas formas de

imunidade para os NV, uma de curto período e a outra de longa duração (PARRINO et al., 1977).

A imunidade para sapovírus é ainda menos conhecida, mas acredita-se que haja uma correlação entre a presença de anticorpos e a resistência à infecção em crianças (FARKAS et al., 2004).

2.2.5- Epidemiologia

Os calicivírus humanos (*Norovírus* e *Sapovírus*) infectam indivíduos de todas as faixas etárias, distinguindo-se, dessa maneira, de outros agentes virais de gastroenterites entéricas, tais como os rotavírus, os astrovírus e os adenovírus que infectam principalmente crianças com até 5 anos de idade (GLASS et al., 2000).

A origem inicial dos surtos de *Norovírus* está associada à água e alimentos contaminados (HEDBERG; OSTERHOLM, 1993). Nessa situação, exerce papel importante a condição de excreção assintomática do vírus, que pode ocorrer por mais de uma semana; indivíduos que manipulam alimentos tornam-se fonte importante da infecção (PÖNKÄ et al., 1999). Nesse sentido, considerando o tipo de população afetada, bem como a fonte da infecção, um estudo foi conduzido em 33 estados dos Estados Unidos onde foram definidas as características epidemiológicas de 90 surtos de gastroenterites não bacterianas em ambientes diferentes. Observou-se que os surtos eram mais comum em asilos (43%) e restaurantes (26%) e que a maior causa de transmissão ocorreu através dos alimentos (37%), contato pessoal (20%), consumo de ostras (10%) e água (6%) (FANKHAUSER et al., 2002). Na Suécia também foi observada a transmissão de calicivírus a partir de epidemias nas quais ficou evidente a participação de manipuladores de alimentos (HEDLUND et al., 2000).

Por outro lado, em muitos casos não se pode definir a fonte comum de infecção. Admite-se, no entanto, a transmissão por gotículas, contato pessoa a pessoa, ou a partir do ambiente. Considerando-se o alto potencial infectivo viral, menos de 100 partículas é o suficiente para iniciar a infecção (PARASHAR et al., 1998; PÖNKÄ et al., 1999; CHRIS, 2003)

Estudos de soroprevalência para calicivírus humanos têm fornecido dados sobre a epidemiologia desses vírus e identificado os principais grupos de risco para a infecção. Tais estudos apontam que a aquisição de anticorpos para os calicivírus aumenta com a idade, alcançando índices que variam de 50 a 90% entre adultos em diferentes partes do mundo. Em países em desenvolvimento, a aquisição desses anticorpos pode ocorrer mais precocemente (HONMA et al., 1999; NAKATA et al., 1998).

Os calicivírus têm sido detectados globalmente com índices que variam de 7,3 a 23,7% (QIÃO et al., 1999; MARRIE CARDINE et al., 2002; COLOMBA et al., 2006; REITHER et al., 2007; CARACCILO et al., 2007). No Brasil, os estudos referentes a calicivírus mostram variados percentuais de detecção: 14,5% no Rio de Janeiro (SOARES et al., 2007), 15% no Recife (NAKAGOMI et al., 2008), 33,3% em São Paulo (CASTILHO et al., 2006) e 39,7% no Espírito Santo (RIBEIRO et al., 2008). Na região Centro-Oeste, um único estudo foi realizado observando índice de 8,6% (BORGES et al., 2006). A doença tem sido um problema de saúde pública também para soldados em campanha. Surto atribuído ao norovírus entre tropas em combate foram observados na Guerra do Golfo Pérsico, onde 70% dos soldados tiveram que ser afastados de combate (GLASS et al., 2000).

Surto e casos esporádicos de gastroenterite aguda causadas por calicivírus podem ocorrer durante todos os meses do ano, embora se observem diferentes

padrões de sazonalidade nos hemisférios norte e sul. No Norte, as gastroenterites são mais comuns no inverno, que é a estação seca; enquanto que, no Sul, elas são mais frequentes no verão (FROGGATT et al., 2004, PARASHAR et al., 2004, BON et al., 2005). Na região Centro-Oeste foi observada maior incidência nos meses de setembro a março, estando a sazonalidade relacionada com a alta umidade relativa do ar (BORGES et al., 2006).

2.2.6- Diagnóstico laboratorial

Esses vírus são de difícil cultivo em cultura de células e até mesmo em animais de experimentação. Todavia, diferentes procedimentos têm sido adotados na tentativa da identificação dos calicivírus humanos. Nesse sentido, o diagnóstico laboratorial compreende tanto ensaios moleculares quanto não-moleculares. Dentre os não-moleculares, a visualização das partículas virais por microscopia eletrônica (ME) tem uso limitado em razão da baixa sensibilidade, o que exige altas concentrações de vírus (10^5 - 10^6 partículas/mL) para visualização, além do alto labor (KOOPMANS et al., 2002). Como alternativa, tem-se a IEM que, além de possuir maior sensibilidade, possibilita a identificação do vírus causador da infecção pela utilização de soro padrão-específico. Algumas modificações desse método, como a imunomicroscopia de fase sólida (SPIEM), também têm sido empregadas para a detecção viral (ATMAR; ESTES, 2001).

Outro procedimento é o ensaio de hemaglutinação por imunoadesência (IAHA), que se destina a avaliar o nível de anticorpos no soro em estudos de soroprevalência. Entretanto, trata-se de um ensaio não eficiente para detecção de antígenos nas fezes por exigir antígeno parcialmente purificado e pela possibilidade da existência de hemaglutininas não específicas no espécime.

O radioimunoensaio (RIA), método de alta sensibilidade, foi desenvolvido como uma alternativa à IEM para detecção de antígenos nas fezes. No entanto é pouco utilizado em função do custo e, também, pela utilização de radioisótopos (GREENBERG et al., 1978).

O ensaio imunoenzimático (EIE) tem sido usado para detecção de antígeno para norovírus em amostras de fezes; possui sensibilidade similar à do RIA, e tem as vantagens de apresentar maior estabilidade dos reagentes utilizados e de não usar radioisótopos (GUO et al., 2001; RICHARDS et al., 2003).

Na década de 90, a utilização de técnicas moleculares para amplificação, seqüenciamento e expressão genômica tornou possível não só a identificação dos calicivírus, mas também a caracterização genética e antigênica. No contexto, a reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR) tem sido o método mais utilizado para a detecção do calicivírus em amostras clínicas e ambientais. Em comparação com a ME, a RT-PCR é mais eficaz na detecção viral e ainda tem a vantagem de apresentar resultados a partir de pequenas quantidades de material viral no espécime. Outro ponto positivo é a possibilidade de se detectar a infecção por um período mais longo depois de debelada a doença (PARASHAR et al., 1998; YAMAZAKI et al., 1996).

Os pares de iniciadores mais utilizados são aqueles desenhados com base no gene para a RNA polimerase viral, uma vez que essa é uma região conservada do 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 e para a helicase, ou mesmo a região RLA3, podem ser utilizadas para desenho de iniciadores específicos para detectar variações (VAINIO et al., 2002). Para ampliar a chance de detecção viral, é aconselhável utilizar múltiplas áreas do genoma como

alvo para os iniciadores, garantindo maior possibilidade de detecção viral (ATMAR; ESTES, 2001; GREEN et al., 1995).

O ensaio de mobilidade heteroduplex (HMA) é outra forma de identificação do ácido nucléico, que pode constituir uma alternativa para o seqüenciamento, por ser menos oneroso e mais rápido (MATTICK et al., 2000).

2.2.7- Prevenção, controle e tratamento

Não existe nenhum método específico para o tratamento da infecção ou da doença causada pelos calicivírus. A reidratação oral é a terapia usualmente empregada. A administração de fluidos por via parenteral pode ser necessária, dependendo da severidade dos sintomas (BRASIL, 2005).

Não existe vacina para esses vírus e, como são altamente infecciosos, a lavagem das mãos, assim como o descarte e a desinfecção do material contaminado, pode reduzir a transmissão familiar e institucional. Cuidados especiais devem ser tomados no processamento dos alimentos em função dos freqüentes surtos de diarreia por NV associados ao consumo de alimentos contaminados. Funcionários doentes não devem preparar alimentos por um período de, pelo menos, três dias após a doença. Luvas devem ser usadas no preparo dos alimentos crus. O consumo de frutos do mar não cozidos é um risco, uma vez que já ocorreram surtos associados ao consumo desses alimentos (KOOPMANS et al., 2002).

2.3- ADENOVÍRUS

2.3.1. Histórico

Os adenovírus foram primeiramente isolados e caracterizados como agentes virais por pesquisadores que estudavam a etiologia das infecções respiratórias agudas. A denominação adenovírus data de 1956, e deu-se devido ao fato de terem sido isolados inicialmente das adenóides e amídalas, em 1953 (ROWE et al., 1953). Posteriormente, outros isolamentos foram realizados por Hilleman e Werner (1954) a partir de amostras clínicas provenientes de militares apresentando doença respiratória e febre. Além de infecção aguda, os adenovírus podem causar infecções latentes, em particular nos tecidos das adenóides e das amídalas (GINSBERG,1999).

Em 1960, foi desenvolvida uma vacina contra os adenovírus pertencentes aos sorotipos 4 e 7. Esses tipos virais eram responsáveis por elevada morbidade na população de recrutas militares em treinamento básico por constituírem particularmente uma população de maior risco para epidemias de doença respiratória aguda (GAYDOS; GAYDOS, 1995).

Em 1962, foi demonstrado que o adenovírus tipo 12 causava tumor em roedor recém-nascido, sendo a primeira descrição de um vírus humano induzindo tumor maligno em animal (TRENTIN et al., 1962). Em humanos, ainda não existem evidências de formação de tumores por adenovírus (KOSULIN et al., 2007).

Em 1975, foi observado por microscopia eletrônica a partir de amostras fecais provenientes de crianças com surto de gastroenterite grande número de partículas de adenovírus (FLEWETT, 1976). Essas partículas não foram cultiváveis em cultura de células, sendo então denominadas adenovírus não cultiváveis ou fastidiosos e,

posteriormente, adenovírus entéricos, por estarem relacionados com quadro de diarreia e serem excretados em grande quantidade nas fezes (GARY et al., 1979).

2.3.2 - Classificação

Os adenovírus pertencem à família *Adenoviridae*, que é composta por quatro gêneros: *Aviadenovirus* (que tem como hospedeiro as aves), *Mastadenovirus* (que tem os mamíferos como hospedeiro), *Atadenovirus* (isolado de répteis, passáros e marsupiais) e *Siadenovirus* (isolado de répteis e pássaros) (BERK, 2007). Com base em características imunológicas, genéticas, biológicas e bioquímicas, os adenovírus humanos estão classificados dentro desse último gênero com 51 sorotipos distribuídos em seis espécies classificadas de A a F (DAVISON et al., 2003). O subgênero A comporta os sorotipos 12, 18 e 31, que foram encontrados como causa de infecção da cripta entérica e associados com a diarreia infantil (NOEL et al., 1994). No entanto os adenovírus classificados como entéricos são os sorotipos 40 e 41 do subgênero F, que compreendem importantes agentes etiológicos de diarreia infantil. Outros sorotipos não entéricos como 2, 3 e 8 dos subgêneros C, D e B, respectivamente, já foram isolados de casos de diarreia infantil (DE JONG et al., 1993; LI et al., 2005)

Os parâmetros utilizados para a classificação dos adenovírus em espécies e sorotipos são: atividade de hemaglutinação, potencial oncogênico, percentual de bases nitrogenadas guanina/citocina (G-C), tamanho da fibra, peso molecular de determinados polipeptídeos estruturais, atividade de neutralização, grau de homologia do DNA e clivagem do genoma por endonucleases de restrição (ADRIAN et al., 1986).

2.3.3 - Estruturas morfológica, genômica e protéica.

Os adenovírus têm simetria icosaédrica formada por 20 superfícies triangulares e 12 vértices. Possuem diâmetro variável de 80 a 100nm e não apresentam envelope. O vírion contém DNA (13%) e proteínas (87%), sendo algumas glicosiladas (RUX ; BURNETT , 2004). O capsídeo viral é formado por 252 capsômeros, sendo 240 em formato de “hexons” e 12 “pentons”. Os pentons apresentam uma unidade basal da qual se projeta uma fibra que apresenta uma esférula em sua parte distal. O tamanho da fibra varia de acordo com o sorotipo. Os epítomos das proteínas formadoras da fibra possuem atividade de hemaglutinina e de neutralização e são, ainda, responsáveis pela adsorção à célula do hospedeiro (BERK, 2007; ENGLER; HONG, 2007).

Os adenovírus possuem como genoma uma molécula de DNA linear de fita dupla, de tamanho aproximado de 35.000 pares de base, com peso molecular $20-30 \times 10^6$ kDa. O genoma possui duas origens de replicação, localizadas em cada porção terminal do DNA, que possui, ainda, diferentes unidades de transcrição transcritas temporalmente. As primeiras unidades transcritas, E1A, E1B, E2A E2B, E3 e E4, são denominadas precoces. A seguir, são transcritas as unidades denominadas pIX e Iva2, e, posteriormente, as unidades de transcrição tardia (L1,L2, L3, L4 L5) que geram cinco famílias de mRNAs (RUSSELL, 2000; DAVISON et al., 2003).

A região E1A codifica duas proteínas com 289 e 243 aminoácidos. Tais proteínas podem ativar o ciclo celular induzindo a célula hospedeira a entrar na fase “S” e fornecendo ambiente ideal para a replicação viral. A E1B codifica duas outras proteínas que, juntamente com os produtos de E1A, também induzem o crescimento

celular. A E2 codifica três diferentes proteínas que funcionam diretamente na replicação do DNA. A E3 codifica produtos que modulam a resposta da infecção adenoviral no hospedeiro, bem como a família de mRNAs tardios, que se relacionam com a produção e montagem dos componentes do capsídio (DAVISON et al., 2003).

a) Proteínas não estruturais

As diferentes regiões de transcrição precoce e tardia codificam para proteínas não estruturais que possuem funções regulatórias, incluindo ativação e repressão transcricional de promotores de genes virais e celulares (RUSSELL, 2000).

b) Proteínas estruturais

O vírion é constituído de 11 polipeptídios que compõem as proteínas estruturais, por convenção denominadas II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X(μ) e TP. O capsídio é composto por sete desses polipeptídios. O polipeptídio II é o constituinte mais abundante entre as proteínas estruturais do capsídio e forma o hexon. Os polipeptídios VI, VIII e IX estão também associados ao hexon e admitem-se que proporcionam estabilidade à partícula. O core do vírion contém o genoma viral e quatro proteínas associadas (V, VII, X e TP), que são básicas e ricas em arginina. O polipeptídio V liga-se à base do penton, formando uma ponte entre o core e o capsídio. O polipeptídio VII é a maior proteína do core e, provavelmente, serve como um centro de histona que envolve e empacota o DNA viral. A função da proteína X é desconhecida. A proteína terminal (TP) é covalentemente ligada ao terminal 5' do DNA viral, serve como um iniciador para replicação do DNA e medeia a ligação do genoma viral à matriz nuclear. Os polipeptídios VI e VIII formam uma ponte entre os componentes do capsídio e o core. A associação de cinco cópias do polipeptídio III forma a proteína base do penton. O polipeptídio IIIa, que circunda o penton, é

associado a unidades do hexon e, provavelmente, une faces adjacentes do capsídio servindo como ponte entre o hexon e o polipeptídio VII do core. O polipeptídio IV forma a proteína trimérica da fibra, que se projeta da base do penton de cada vértice do icosaedro (VELLINGA et al., 2005; BERK, 2007).

Os determinantes antigênicos tipo-específicos estão presentes nas três estruturas do capsídio (hexon, penton e fibra). Anticorpos neutralizantes para adenovírus são produzidos principalmente para epítomos do hexon e da fibra, embora também sejam produzidos para epítomos da base do penton. A fibra possui uma esférula distal que contém receptor de ligação. A base do penton possui um determinante gênero-específico denominado *beta*, além de determinantes da espécie e sorotipo. Em relação à fibra, a complexidade antigênica cresce proporcionalmente ao seu comprimento. Portanto, adenovírus do subgênero B possuem apenas o determinante antigênico tipo-específico, denominado *gama*, que é localizado na esférula, enquanto que os adenovírus A, C e D possuem um determinante específico delta. O hexon possui determinante tipo-específico denominado *epsilon* e determinante antigênico gênero-específico denominado *alfa* (VELLINGA et al., 2005; ENGLER; HONG 2007).

2.3.4- Patogenia, sintomatologia e imunidade

O tropismo celular dos adenovírus é variado e pode causar infecções líticas em células mucoepiteliais do aparelho respiratório, conjuntival e gastrintestinal, atingindo o tecido linfóide, onde podem causar infecções persistentes. Esses vírus podem ingressar na corrente circulatória e produzir infecções em outros tecidos do organismo (FLOMENBERG et al., 1997).

O período de incubação dos adenovírus pode variar de três a dez dias. Acredita-se que as alterações patológicas sejam devidas ao dano tissular direto, determinado pelo processo de replicação viral dentro das células suscetíveis. A lesão tissular pode ocorrer também por mecanismos imunopatológicos. Os adenovírus infectam diferentes tecidos do hospedeiro e podem causar uma grande variedade de síndromes clínicas em humanos. Muitos sorotipos desses vírus tornam-se latentes em tecidos linfóides e rins, e sua reativação é verificada em pacientes imunocomprometidos. Podem ainda causar doenças severas tais como pneumonias, hepatite, meningoencefalite, hemorragia cística, diarreia, ceratoconjuntivite e miocardite (HIERHOLZER, 1992; WOLD; HORWITZ, 2007).

Três formas clínicas principais têm sido associadas aos diferentes tipos inclusos nos diferentes subgêneros de adenovírus:

a) sorotipos dos subgêneros A (12, 18 e 31), C (1, 2, 5 e 6) e F (40 e 41) são associados a infecções do trato gastrintestinal, sendo que os do subgênero F exibem um tropismo de órgão mais restrito do que os do subgênero A e C (HIERHOLZER, 1992; NOEL et al., 1994; OKITSU-NEGISHI et al., 2004; FODHA et al., 2007).

b) sorotipos dos subgêneros B, D e E são relacionados com doença respiratória e ceratoconjuntivite. Os sorotipos 3 e 7 (subgênero B) e 4 (subgênero E) são os agentes mais comuns de doenças respiratórias em crianças e militares (LARRANAGA et al., 2000), ao passo que os sorotipos 8, 19, e 37 (subgênero D) estão relacionados com quadro de ceratoconjuntivite (HUSSAIN et al., 1996; CURTIS et al., 1998). O tipo 37 pode causar também úlcera genital e uretrite (SWENSON et al., 1995).

c) sorotipos do subgênero C são associados a infecções persistentes em adenóides, amídalas e infecções do trato respiratório inferior (HIERHOLZER et al., 1988).

Manifestações menos frequentes incluem cistite hemorrágica, miocardite, pericardite, pancreatite e meningoencefalite (MUNOZ et al., 1998).

As infecções por adenovírus podem ser severas, embora raramente fatais em indivíduos adultos. No entanto, em crianças e adultos imunocomprometidos, casos fatais podem acontecer (SCHNURR et al., 1995). Em crianças, pode-se ainda observar envolvimento pulmonar, hepático e renal (MUNOZ et al., 1998).

A imunidade mediada por anticorpos é sorotipo-específica, sendo importante na resolução das infecções líticas e na proteção contra a reinfeção por um mesmo sorotipo. Anticorpos tipo-específicos contra a fibra inibem a sua adsorção aos receptores celulares (ENGLER; HONG, 2007). Os anticorpos neutralizantes, inibidores da hemaglutinação e fixadores do complemento, aparecem sete dias após o surgimento dos sintomas e atingem concentração máxima em duas a três semanas. Os anticorpos fixadores do complemento persistem por seis a doze meses após a infecção, enquanto os neutralizantes e inibidores da hemaglutinação permanecem por oito a dez anos. A imunidade celular é importante para limitar a produção viral, como evidenciado pela presença de doença recorrente em pacientes imunocomprometidos (WOLD; HORWITZ, 2007).

2.3.5- Epidemiologia

Os adenovírus entéricos são considerados importantes agentes virais da doença diarréica infantil no mundo. Mas podem ocorrer em indivíduos de todas as idades, principalmente em períodos de surtos, havendo também evidências de transmissão nosocomial (WRIGTH; BIELUCH, 1993). Constituem ainda, importante causa de hospitalização depois dos *Rotavírus A*. Muitas amostras positivas para adenovírus provêm de crianças assintomáticas, demonstrando que, durante epidemias, muitas crianças infectadas podem transmitir a doença, embora não a desenvolvam (WOOD et al., 1988; GLASS et al., 2001; SHIMIZU et al., 2007).

A transmissão dos adenovírus entéricos ocorre pela via oral-fecal, por perdigotos respiratórios ou ainda por fômites contaminados. Como referido, esses vírus apresentam elevado risco de infecção para idosos e crianças com menos de 2 anos de idade. São ainda predisponentes para a aquisição da infecção viral, indivíduos que necessitem de cuidados diários (crianças e idosos), indivíduos de baixo poder aquisitivo vivendo em condições precárias, e indivíduos imunocomprometidos. Fatores do hospedeiro como a má-nutrição, doença genética ou metabólica, doenças crônicas do coração e do pulmão, bem como deficiências imunológicas, contribuem para a gravidade da doença (NOEL et al., 1994; MUNOZ et al., 1998; WILHELMI et al., 2003; LOGAN et al., 2006).

Como citado anteriormente, os tipos mais freqüentes de adenovírus associados a gastroenterites são os sorotipos Ad40 e Ad41 pertencentes ao subgênero F; e, mais raramente, os sorotipos Ad12, Ad31, Ad18 do subgênero A e os sorotipos Ad1, Ad2 Ad5 e Ad6 do subgênero C (HIERHOLZER, 1992; NOEL et al., 1994; OKITSU-NEGISHI et al., 2004; FODHA et al., 2007).

Os percentuais de detecção de adenovírus em diferentes partes do mundo são variáveis. Assim, índice de 6% foi observado em crianças na Tunísia (FODHA et al., 2007) e de 3,4% no Japão (FUKUDA et al., 2006), enquanto que na China o índice observado foi de 2,5% (OKITSU-NEGISHI et al., 2004). Além desses dados, índices de 2,8% e 1,6% foram observados, respectivamente, em Bangladesh (JARECKI-KHAN et al., 1993) e na Itália (CARACCILO et al., 2007); e 4,4% foi a média de detecção viral encontrada em estudos realizados na Coreia, Japão e Vietnã (LI et al., 2005).

No Brasil têm sido também observados índices variados de detecção de adenovírus como de 1,25% em Niterói-RJ (SOARES et al., 2002), de 2% no Rio de Janeiro-RJ (PEREIRA FILHO et al., 2007) e de 6,3% em Porto Velho-RO (ORLANDI et al., 2006). Em Londrina-PR e Juiz de Fora-MG os índices observados foram de 0,97% e 1,76%, respectivamente (SOARES et al., 2002). Em Goiânia-GO, Camarota et al. (1992) observaram percentual de 1,6% em fezes de crianças sem quadro de gastroenterite, enquanto que, no mesmo ano, Cardoso et al. (1992) observaram percentual de 2,4% em crianças com gastroenterite.

Vários autores apresentam padrão de sazonalidade para a ocorrência de infecções entéricas causadas pelos adenovírus (JARECKI-KHAN et al., 1993; GRIMWOOD et al., 1995, LI et al., 2005, SHIMIZU et al., 2007; PEREIRA FILHO et al., 2007). Por outro lado, outros estudos revelam uma distribuição mais homogênea da infecção pelo adenovírus ao longo do ano (UHNOO et al., 1984; CRUZ et al., 1990; DE JONG et al., 1993; LIN et al., 2000; SOARES et al., 2002).

De uma maneira geral, os adenovírus são detectados de forma similar em crianças de ambos os gêneros, embora vários estudos tenham mostrado maior índice

de detecção em crianças do gênero masculino (CRUZ et al., 1990; JARECKI-KHAN et al., 1993; LIN et al., 2000).

2.3.6- Diagnóstico laboratorial

Os adenovírus podem ser detectados em uma grande variedade de espécimes biológicos, como aspirado de nasofaringe, *swab* de garganta, nariz e conjuntiva, fluido cérebro-espinhal, sangue, urina, fezes e, ainda, a partir de biópsias. O tipo de espécime é indicado de acordo com o quadro clínico sugestivo (WOLD; HORWITZ, 2007).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por vários procedimentos, dentre os quais o isolamento em cultura celular. As linhagens celulares permissivas para adenovírus mostram efeito citopático típico, observando-se células arredondadas, refratáveis e com tamanho aumentado. Muitas apresentam inclusões citoplasmáticas e podem, ainda, apresentar agrupamento semelhante a “cacho de uva”. O cultivo celular, além de promover o isolamento viral, apresenta a vantagem de aumentar a quantidade de partículas virais para posterior caracterização (RUUSKANEM et al., 1997). A identificação dos adenovírus isolados em cultura celular pode ser realizada por testes de imunofluorescência (IF) ou testes de fixação do complemento (FC), usando antígenos e anticorpos padrão-específicos, o que permite a identificação para todos os isolados humanos. Testes de inibição da hemaglutinação (IH) e soroneutralização (SN) permitem a identificação de adenovírus tipo-específico e a distinção dos membros de cada grupo (WOLD; HORWITZ, 2007)

O ensaio imunoenzimático (EIE) e a aglutinação em látex, bem como a microscopia eletrônica, têm sido utilizados para detectar adenovírus entéricos (Ad40 e Ad41) (VIZZI et al., 1996).

Da mesma forma, técnicas de biologia molecular como hibridização *in situ*, digestão do DNA viral com endonucleases de restrição e a PCR têm sido utilizadas tanto para identificação de subgênero/sorotipo quanto para a detecção do genoma viral (ALLARD et al., 1992; LOGAN et al., 2006). A reação em cadeia pela polimerase é uma das técnicas utilizadas para a detecção do DNA viral em amostras nas quais a quantidade é insuficiente para a detecção por outros métodos, sendo o produto da amplificação visualizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose (HUSSAIN et al., 1996).

2.3.7- Prevenção, controle e tratamento

Considerando que a maioria das infecções por adenovírus é assintomática, não existe um tratamento específico a não ser em pacientes imunocomprometidos, para os quais há grande interesse no desenvolvimento de drogas antivirais (KINCHINGTON et al., 2005).

O tratamento das gastroenterites virais é sintomático e conduzido pelo controle dos sintomas apresentados pela doença. Para isso, é extremamente importante a reposição imediata de eletrólitos, devido a diarreia e vômito (BRASIL, 2005).

Mostra-se muito importante a interrupção da transmissão em hospitais, centro de cuidados de crianças e instituições que cuidam de idosos. Essa medida pode ser alcançada por meio de isolamento do indivíduo e reforço das medidas de

higiene pessoal e limpeza do ambiente e das superfícies com desinfetantes adequados (WOLD; HORWITZ, 2007)

Existe uma vacina oral efetiva para os sorotipos Ad4 e Ad7, sendo essa vacina disponível para militares, e não para a população civil em geral (GAYDOS; GAYDOS, 1995 ;WOLD; HORWITZ, 2007).

2.4- ROTAVÍRUS

2.4.1. Histórico

Em 1973, Bishop et al. observaram, por ME, partículas virais de aproximadamente 75nm em mucosa duodenal de crianças com diarreia grave. Essas partículas, também observadas posteriormente em fezes de crianças que apresentavam a mesma síndrome (FLEWETT, 1976), foram então identificadas como rotavírus. Desde então, estabeleceram-se como importante agente etiológico de gastroenterite, sendo considerados, em todo o mundo, responsáveis por cerca de 30% a 50% das diarreias graves em países desenvolvidos e em desenvolvimento (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

2.4.2. Classificação

Os rotavírus, após diferentes nomenclaturas, foram assim denominados em função de sua aparência em forma de roda de carroça (do latim *rota*), quando vistos por microscopia eletrônica. Essa nomenclatura foi aceita e oficializada pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), em 1979, sendo incluídos em um novo gênero da família Reoviridae, a qual inclui ainda vírus que infectam

plantas, insetos, fungos, aves, répteis, peixes e moluscos. Os gêneros que infectam mamíferos são: *Orthoreovirus*, *Rotavirus*, *Orbivirus*, *Coltivirus* e *Seadornavirus*.

2.4.3- Estruturas morfológica, genômica e protéica

Os rotavírus apresentam morfologia esférica com aproximadamente 75nm de diâmetro. Possuem simetria icosaédrica formada por três camadas de proteínas que formam os capsídeos externo, intermediário e interno. Não possuem envelope lipídico e o genoma é composto de onze segmentos de RNA de dupla fita (dsRNA) (ESTES; KAPIKIAN, 2007). Seis dos onze segmentos genômicos dos Rotavirus do grupo A codificam seis proteínas estruturais do vírus e os outros cinco, igualmente, seis proteínas não estruturais. As proteínas estruturais denominadas pela sigla VP são seguidas de um número arábico correspondente 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. As proteínas não estruturais, denominadas NSP (1-6), são codificadas pelos demais segmentos genômicos, sendo que o segmento onze é responsável pela codificação de duas dessas proteínas (NSP5 e 6). Essas proteínas são detectadas nas células infectadas, mas não nas partículas virais maduras (ESTES& COHEN,1989; KAPIKIAN et al.,2001; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O capsídeo interno ou *core* é formado pelas proteínas VP2 em associação a poucas cópias de VP1 e VP3. A VP1 é constituída de 1088 aminoácidos (ESTES; COHEN, 1989; MANSELL; PATTON, 1990) e é considerada a RNA polimerase viral. Possui atividade de replicase, bem como de transcriptase (PATTON; CHEN, 1999). A proteína VP2, codificada pelo segundo segmento genômico, constituída de 880 aminoácidos, é imunogênica e constitui a proteína mais abundante do *core*. É

necessária para a replicação do genoma viral e possui atividade de ligação ao ácido nucléico de fita simples ou dupla (ESTES; COHEN, 1989; MANSELL; PATTON, 1990). A VP3 é codificada pelo terceiro segmento genômico, possui 835 aminoácidos e admite-se que tenha atividade de guanililtransferase (ESTES; COHEN, 1989; PIZARRO et al., 1991).

O capsídeo interno é formado pela proteína VP6, que é formada por 397 aminoácidos e possui massa molecular aproximada de $4,5 \times 10^4$ daltons. É codificada pelo sexto segmento do genoma e constitui a maior massa protéica da partícula viral madura. Interage com as proteínas VP4, VP7 e VP2. A VP6 encontra-se organizada na forma de trímero, possui propriedades imunogênica e antigênica e parece existir uma correlação entre a imunidade clínica e os altos títulos de anticorpos contra essa proteína viral. Parece, também, que ela tem papel na transcrição e replicação viral. Ainda nessa proteína, situam-se determinantes antigênicos responsáveis pela classificação dos rotavírus em grupos de A a G. Para *Rotavirus A*, a VP6 mostra, também, variações para subgrupos, sendo que, até o momento, foram descritos os subgrupos denominados I, II, I e II e não I não II (ESTES; COHEN, 1989; PATTON; CHEN, 1999; ESTES; KAPIKIAN, 2007). A VP6 é passível de detecção pela maioria das técnicas sorológicas rotineiramente utilizadas como recurso de diagnóstico para detecção de *Rotavirus A*.

O capsídeo externo da partícula viral madura é formado pelas proteínas VP4 e VP7. A proteína VP4 é formada por 776 aminoácidos, possui massa molecular de $8,7 \times 10^4$ daltons e é codificada pelo quarto segmento genômico. Ela se projeta além da superfície da partícula viral, formando 60 espículas. Tais espículas atravessam a camada mais externa do vírus por intermédio de canais e são responsáveis pela

adsorção do vírus à célula hospedeira. A VP4 é sensível às proteases e, quando clivada por essas enzimas, resulta, como referido, em duas proteínas: a VP5*, de 529 aminoácidos; e a VP8*, de 247 aminoácidos. A VP4 é imunogênica e variações nessa proteína levam a diferentes sorotipos/genótipos P (sensível à protease). Os sorotipos P são assim denominados quando identificados por métodos sorológicos; e os genótipos P, quando por métodos moleculares. A nomenclatura dos sorotipos de VP4 é feita utilizando a letra P seguida de algarismo arábico, enquanto que, para genótipos, utiliza-se também a letra P, mas com o numeral dentro de colchete. Por método sorológico, têm sido identificados 14 sorotipos P e, por método molecular, 27 genótipos P (ESTES; COHEN, 1989; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP7 é uma glicoproteína formada por 326 aminoácidos, possui massa molecular aproximada de $3,7 \times 10^4$ daltons e pode ser codificada pelos segmentos genômicos 7, 8 ou 9, dependendo da amostra viral. É altamente imunogênica, responsável pela produção de anticorpos neutralizantes, e apresenta variações antigênicas, o que leva à ocorrência, até o momento, de 15 tipos de VP7, que são denominados sorotipos/genótipos G (glicoproteína). Para VP7, a nomenclatura é sempre G, independentemente de sorotipo ou genótipo, aos quais são correspondentes (ESTES; COHEN, 1989).

A NSP1, codificada pelo quinto segmento do genoma viral, é uma proteína básica que contém 486 a 495 aminoácidos (OKADA et al., 1999) e possui massa molecular de $5,8 \times 10^4$ daltons (ESTES; COHEN, 1989). A NSP2 é codificada pelo segmento genômico 7, 8 ou 9, dependendo da amostra viral. É também uma proteína básica e é expressa em níveis elevados na célula infectada (APONTE et al., 1996; TARAPOREWALA et al., 1999).

A NSP3 também é codificada pelo segmento 7, 8 e 9 do genoma viral. Possui 315 aminoácidos e massa molecular de $3,4 \times 10^4$ daltons (ESTES; COHEN, 1989).

A NSP4 é codificada pelo décimo segmento do genoma viral, possui 175 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 2×10^4 daltons. Constitui uma das proteínas integrais da membrana do retículo endoplasmático da célula hospedeira (ESTES & COHEN, 1989). Trata-se de uma proteína multifuncional e foi a primeira descrita como enterotoxina viral, agindo como receptor intracelular. Acredita-se que a sua atividade enterotoxigênica esteja relacionada com a capacidade de mobilizar Ca^{++} e interferir na homeostase celular. A NSP4 induz diarreia e danos histológicos em modelos animais (CIARLET; ESTES, 2001; LUNDGREN; SVENSSON, 2001). É imunogênica e variações nessa proteína determinam diferentes grupos (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A NSP5 é uma proteína não estrutural, fosforilada e codificada pelo décimo primeiro segmento do genoma. Possui aproximadamente 198 aminoácidos e massa molecular de $2,1 \times 10^4$ dalton (GONZÁLES et al., 1998).

A NSP6 também é codificada pelo décimo primeiro segmento do genoma viral, possui 397 aminoácidos e massa molecular aproximada de $1,2 \times 10^4$ daltons (GONZÁLES et al., 1998; VAN REGENMORTEL et al., 2004).

2.4.4- Patogenia, sintomatologia e imunidade

Os *Rotavirus A* infectam principalmente os enterócitos maduros da extremidade das vilosidades presentes na mucosa do intestino delgado (LUNDGREN; SVENSSON, 2001), sendo que o processo replicativo ocorre no

citoplasma. Após 8 horas de adsorção do vírus, já se observa na célula infectada a presença de inclusões citoplasmáticas que contêm proteínas e RNA viral recém-sintetizados. O processo infeccioso pode culminar com manifestações clínicas que se instalam em aproximadamente 48 horas. As gastroenterites por rotavírus não se constituem por manifestações clínicas típicas que as diferem daquelas associadas a outras etiologias. Porém, a intensidade de alguns sintomas, como aparecimento de vômito, além da faixa etária envolvida, podem auxiliar na elucidação da causa viral em determinadas situações. 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 e aspecto gorduroso que dura de três a oito 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 (OLIVEIRA; LINHARES, 1999). 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 autolimitada, com a completa recuperação da morfologia e da função intestinal e com o desenvolvimento de anticorpos circulantes; entretanto pode ser fatal em lactentes, desnutridos, desidratados e crianças de baixo peso e idosos (FARTHING, 2000).

Esses vírus são eliminados em grande número nas fezes dos indivíduos infectados. Estima-se que seja encontrado cerca de um trilhão de partículas virais por milímetro de espécime fecal e considera-se que apenas 10 partículas sejam suficientes para iniciar um processo infeccioso. Esses parâmetros, associados à sua

notória estabilidade físico-química, são os principais determinantes da alta transmissibilidade dos rotavírus (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O papel do sistema imune em relação à infecção natural ou vacinal por *Rotavírus A* é complexo. Considera-se, no entanto, que tanto a infecção pelo vírus selvagem quanto pelo vírus vacinal induz uma resposta imune que protege contra as formas graves da doença em infecções sucessivas (VELASQUEZ et al., 2000). O papel das proteínas VP7 e VP4 como principais indutoras na produção de anticorpos neutralizantes já é bem definido. Considera-se, por outro lado, que a proteína VP7 induz não só a formação de anticorpos contra sorotipos específicos mas também de anticorpos que reagem de forma cruzada entre os sorotipos G. (ESTES & COHEN, 1989). Também a proteína NSP4 parece ser responsável pela indução da resposta imune humoral, além de participar da ativação da resposta imune celular em humanos (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A imunidade local, produzida por IgA secretória na luz intestinal, parece conferir maior proteção contra diarreia por rotavírus. Já foi comprovado também que os anticorpos da classe IgA, transferidos passivamente, conferem a proteção do recém-nascido para quadros de diarreias graves. A vacina oral pode também estimular a produção de células B de memória na lâmina própria do intestino, oferecendo proteção contra doença associada com a infecção natural (VELÁSQUEZ et al., 2000; FARTHING, 2000).

2.4.5- Epidemiologia

O Rotavírus do grupo A vem sendo considerado o agente etiológico mais freqüente em diarreia aguda em crianças hospitalizadas em todo o mundo (ESTES; KAPIKIAN, 2007). A doença ocorre mais freqüentemente dos seis aos 24 primeiros

meses de idade, e o pico de infecção tende a ocorrer dos seis aos nove meses em países em desenvolvimento, e dos nove aos 15 meses em países industrializados. Velazquez e colaboradores, em 2000, notaram que 96% das crianças até os dois anos de idade já tiveram infecção pelo rotavírus; durante o mesmo período, perto de 70% das crianças tiveram a segunda infecção. Mais que 10% das crianças estudadas tiveram cinco ou mais infecções durante os seus dois primeiros anos de vida; mais de 85% possuem anticorpos para dois ou mais sorotipos diferentes. Os rotavírus são considerados vírus “democráticos”, pois crianças de todas as condições sócio-econômicas, que vivem em áreas tropicais ou temperadas, podem ser acometidas pela infecção (DOAN et al., 2003). No adulto, as infecções por rotavírus tendem a ser subclínicas e são mais comuns em surtos epidêmicos, viajantes, grupos geriátricos, podendo ser fatal (BISHOP, 1994). A infecção pode ocorrer também em indivíduos imunocomprometidos e adultos que estão em constante contacto com crianças infectadas, as quais, em geral, não apresentam sintomatologia, (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2000; WILHELMI et al., 2003; ANDERSON; WEBER, 2004).

Os rotavírus do grupo B têm sido responsáveis por epidemias graves de gastroenterites em adultos em várias partes da China (HUNG et al., 1987). Também têm sido observados em algumas crianças e adultos em Bangladesh (SANEKATA et al., 2003) e na Índia (KELKAR; ZADE, 2004).

Foi observado que a infecção pelo rotavírus em crianças de uma maneira geral apresenta um padrão sazonal, com maior pico de incidência nos meses do inverno, porém vários estudos mostram dados diferentes. Nos adultos, entretanto, não foi encontrado um padrão de sazonalidade, como observado nas crianças (ITURRIZA-GOMARA et al; 2000; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

2.4.6- Diagnóstico laboratorial

Nas gastroenterites é importante a confirmação do diagnóstico laboratorial porque, além de diferentes tipos de vírus, outros enteropatógenos podem estar envolvidos na etiologia da doença. O diagnóstico laboratorial baseia-se principalmente na pesquisa do vírus e dos antígenos presentes nas fezes de pacientes infectados. Técnicas imunológicas rotineiramente utilizadas são o ensaio imunoenzimático, a aglutinação de partículas de látex e a imunomicroscopia eletrônica (IME). As técnicas não imunológicas mais utilizadas são a direta (ME) e a EGPA (PEREIRA et al., 1983; NAKATA et al., 1987).

A EGPA é um método sensível e específico que, além de permitir o diagnóstico das infecções por Rotavírus A e não A, possibilita a classificação da amostra viral com base no padrão eletroferotípico. Esse método é utilizado para vírus de genoma segmentado, principalmente da família Reoviridae (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A caracterização de amostras de Rotavírus A em subgrupos e genótipos G e P é em geral necessária para o monitoramento desse vírus (GOUVEA et al., 1990; GENTSCH et al., 1992). Essa caracterização tem sido feita tanto por métodos imunológicos que utilizam anticorpos monoclonais específicos de subgrupo e ou de sorotipo quanto por métodos moleculares a partir de procedimentos que utilizam iniciadores específicos, seja com a finalidade de amplificação genômica, RT-NESTED-PCR ou como detectores em ensaio de hibridização, marcados com material radioativo ou não. A PCR é uma técnica de amplificação usada para sintetizar, *in vitro*, seqüências específicas de DNA. Inicialmente, um ácido nucléico alvo (DNA ou RNA) é isolado. Se o ácido nucléico alvo é RNA, ele deve ser convertido em cDNA através de transcrição reversa antes de começar o processo de

amplificação (RT - PCR). A partir daí, o DNA é amplificado enzimaticamente através do PCR. A *Nested-PCR* é a amplificação de um produto já amplificado utilizando *primers* específicos (SANTOS et al., 2002).

2.4.7- Prevenção, controle e tratamento

Como já referido, acredita-se que mundialmente todas as crianças já tenham sido acometidas pela infecção por rotavírus quando alcançam a idade de quatro anos, sendo que os indicadores de morbidade em países em desenvolvimento são comparáveis aos dos países desenvolvidos (BRESEE et al., 1999).

Práticas de higiene como lavagem das mãos, cuidados com a água e os alimentos, destinação adequada dos dejetos humanos e dos animais não parecem determinar o impacto suficiente para o controle e a profilaxia das infecções por *Rotavirus A*, pois, nos países desenvolvidos, onde os padrões de higiene são satisfatórios, repetem-se anualmente extensas epidemias (KAFETZIS et al., 2001).

Admite-se também que certas dificuldades podem 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 de precauções padrão, como a lavagem rigorosa das mãos e o uso de equipamentos de proteção individual como luvas, gorro e máscaras, são recomendadas durante os cuidados com o paciente infectado por esses agentes (ANDERSON; WEBER, 2004).

Considerando-se que a via de transmissão desses vírus é a oral-fecal, o tratamento dos dejetos e a melhoria das condições sanitárias constituem, ainda, medidas de controle. Considerando que não existe tratamento antiviral específico, os

pacientes devem ser tratados baseados na sintomatologia.

Nesse contexto, admite-se que a redução da mortalidade infantil nos países desenvolvidos, nos últimos anos, deva-se não só ao diagnóstico precoce, mas, principalmente, ao acesso rápido aos sistemas de saúde e à presteza na administração da terapia de reposição hidroeletrólítica, oral ou venosa, principalmente nos casos que envolvem vômitos constantes (ALAM; ASHRAF, 2003; FARTING, 2000).

A morbidade e a mortalidade associadas à gastroenterite por Rotavírus A resultam de desidratação e desequilíbrio eletrolítico. Nesse caso, o objetivo do tratamento é a reposição de líquidos para a correção do volume sangüíneo e a manutenção do equilíbrio ácido básico (ALAM; ASHARAF, 2003). Outro procedimento de tratamento consiste no manejo dietético. Nesse sentido, recomenda-se a manutenção da dieta, principalmente se o aleitamento for natural, uma vez que se considera que a amamentação no peito é uma das ações protetoras de melhor eficácia, pela imunidade que confere e pelo poder protetor de fatores inespecíficos presentes no leite materno (GOLDING et al., 1997). Prevalece, no entanto, o conceito de que o recurso mais efetivo de profilaxia das diarreias por rotavírus reside na obtenção de um imunizante eficaz (BRESEE et al., 1999).

A vacina para *Rotavírus A* no Brasil foi licenciada pela ANVISA em julho de 2005, registro nº 10107024300 publicado em 11/ 07/ 2005 no Diário Oficial da União (DOU). A partir de março de 2006, foi incluída no calendário básico de vacinação com o nome de Vacina Oral de Rotavírus (VORH). A vacina é administrada em duas doses e pode ser encontrada nas redes pública e privada (BRASIL, 2005).

3- OBJETIVOS

3.1-OBJETIVO GERAL

- Definir a etiologia da gastroenterite viral em crianças hospitalizadas e em idosos institucionalizados, na cidade de Campo Grande, MS.

3.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a ocorrência dos vírus entéricos (astrovírus, calicivírus e adenovírus) em crianças hospitalizadas com até 3 anos de idade e em idosos institucionalizados da cidade de Campo Grande, MS.
- Verificar a presença de co-infecções para os vírus estudados na população analisada.
- Analisar a positividade viral em relação a faixa etária, gênero e sintomatologia na população envolvidas no estudo.

4- MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada neste estudo está descrita nos artigos submetidos às revistas científicas **Memórias do Intituto Oswaldo Cruz** e **Brazilian Journal of Infection Disease**, que estão apresentados nas páginas 64 e 76, respectivamente.

Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil

Marcia Sueli Assis Andreasi[†], Divina das Dores de Paula Cardoso¹, Sonia Maria Fernandes, Ines Aparecida Tozetti, Ana Maria Tavares Borges¹, Fabíola Souza Fiaccadori¹, Rodrigo Alessandro Tôgo Santos¹, Menira Souza¹

Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil ¹Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

We analyzed fecal samples from hospitalized children up to three years of age with acute gastroenteritis at Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, from May 2000-January 2004. Astrovirus and calicivirus were detected by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction and adenovirus was detected using the Rotavirus and Adenovirus combined immunoenzyme assay. Astrovirus, adenovirus and calicivirus were detected at rates of 3.1%, 3.6% and 7.6%, respectively. These results re-emphasize the need for the establishment of regional vigilance systems to evaluate the impact of enteric viruses on viral gastroenteritis.

Key words: calicivirus - adenovirus - astrovirus - gastroenteritis

Acute gastroenteritis is one of the most common childhood diseases, especially in developing countries. Annually, 2.5 million deaths are estimated to occur, which greatly impact the population of children younger than five years of age (Girard et al. 2006). Over 20 different types of viruses have been identified as etiological agents for this disease (Wilhelmi et al. 2003). Group A rotavirus are considered to be the main agents, followed by calicivirus, adenovirus and astrovirus. Globally, these viruses are responsible for diarrhea episodes in hospitalized children, with detection rates varying from 20-60%, 3.5-29.3%, 1-31% and 1.8-16%, respectively (Jakab et al. 2005, Caracciolo et al. 2007, Fodha et al. 2007). In Brazil, similar detection rates have been observed (Resque et al. 2007, Soares et al. 2007), including those studied in Goiânia, located in the Central-West region of Brazil (Cardoso et al. 2002, Santos et al. 2007).

In Campo Grande, the unique data concerning the etiology of acute gastroenteritis in children refer to group A rotavirus, with detection rates of 23.2% detected in children up to three years old (Andreasi et al. 2007). Considering the need for constant monitoring of viral gastroenteritis in establishing prevention programs, the present study aimed to detect enteric viruses in fecal samples obtained from hospitalized children with acute diarrhea in Campo Grande.

PATIENTS, MATERIAL AND METHODS

This study was performed between May 2000-January 2004, using fecal samples collected from hospitalized children, under three years of age, with acute gastroenteritis at Santa Casa de Misericórdia from Campo Grande and Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. The inclusion criteria were defined as the occurrence of acute gastroenteritis, characterized as liquid or semi liquid, with three or more evacuations in a 24 h period. The collection of fecal samples was carried out in the first 24 h of hospitalization, after written informed consent was provided by parents or legal guardians. This study was approved by the Ethical Committee on Research of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (protocol 599).

Astrovirus and calicivirus were detected by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), using 20% fecal suspension (phosphate buffered saline pH 7.4). Viral ssRNA extraction was performed according to the Boom et al. (1990) method modified by Cardoso et al. (2002). We used the random primer pd(N)6 (Random Hexamer, Amersham Biosciences) to obtain cDNA and the PCR was carried out using the primers Mon 269 and 270 for astrovirus (Noel et al. 1995) and Ni/E3 (Green et al. 1995), JV12/13 (Vinjé et al. 1997) and 289/290 (Jiang et al. 1999) for calicivirus. Samples known to be positive for astrovirus and calicivirus and sterile Milli-Q water were included in all reactions as positive and negative controls, respectively. Adenovirus was detected by Rotavirus and Adenovirus Combined Immunoenzyme Assay, following methodology described by Pereira et al. (1985) to detect the *Mastadenovirus* genus. Statistical analysis was carried out using Epi-info software, version 6.0. Positivity proportion analysis was done by Chi-square test (χ^2) with a 95% confidence interval and Fisher's exact test, when necessary.

Financial support: CNPq
[†] Corresponding author: msaa@nin.ufms.br
 Received 3 June 2008
 Accepted 16 September 2008

RESULTS

Adenovirus and calicivirus were examined in 415 and 406 fecal samples, respectively, while 354 fecal samples were used for astrovirus detection. The positivity rates observed were of 3.1%, 3.6% and 7.6% for astrovirus, adenovirus and calicivirus, respectively. The three types of viruses were detected only in children less than 24 months old, although no statistically significant differences were observed regarding positivity for any virus researched among any of the age groups (Table I).

There was no statistically significant difference in viral positivity between children with diarrhea alone, as compared to children exhibiting additional symptoms, such as vomiting, fever and abdominal pain. However, of the entire group of 316 children whose samples were used for detection of all three types of viruses, and for which there was complete information regarding clinical status, 85 also presented with respiratory complaints. Analysis of viral positivity with respect to the presence or absence of respiratory complaints demonstrated that astrovirus was detected only in children without respiratory complaints, whereas adenovirus and calicivirus were detected in three and seven children with respiratory symptoms, respectively.

Ten children demonstrated positivity to more than one type of virus. Among these, nine were infected with group A rotavirus; five out of these nine children were co-infected with astrovirus, two with adenovirus and

two with calicivirus. The other child showed positivity to astrovirus and calicivirus. The results relative to group A rotavirus have been published previously (Andreasi 2007).

Analysis of viral detection with respect to the number of days of diarrhea was performed in 308 children. The highest detection rate of astrovirus was observed in the first day of diarrhea (14.2%). Adenovirus was mainly detected in children on the third day of disease (6.6%), while calicivirus showed increasing positivity related to days of disease, with the highest detection rates beginning on the fifty day of disease (8.8%-12.1%; $p = 0.034$). Calicivirus was mainly detected in female children.

All three virus types were predominantly detected in 2002 and 2003, with calicivirus being predominant in 2002 (Table II). Additionally, all types of viruses circulated in all months of the year, and, although calicivirus showed high occurrence in March-April, this difference was not observed when analysis was performed with respect to the different seasons of the year.

From the 31 positive samples for calicivirus, 20 showed positivity to the Ni/E3 primers, eight to the 289/290 primers, two to the JV12/13 primers and one to the Ni/E3 and 289/290 primers.

There was no information regarding bacterial or parasite infection among the children in this study. We did not observe any correlation between viral infection and duration of symptoms or days of hospitalization.

TABLE I
Distribution of the astrovirus, adenovirus and calicivirus positive samples related to age groups

Age group (months)	Astrovirus		Adenovirus		Calicivirus	
	Positive/total	%	Positive/total	%	Positive/total	%
<1	-/1	-	-/2	-	-/2	-
1-6	4/115	3.5	4/130	3.0	10/126	7.9
7-12	5/139	3.5	5/168	3.0	15/163	9.2
13-24	2/90	2.2	6/105	5.7	6/104	5.8
25-36	-/8	-	-/9	-	-/10	-
37-48	-/1	-	-/1	-	-/1	-
Total	11/354	3.1	15/415	3.6	31/406	7.6
p	0.6970 ^a		0.3485 ^a		0.5211 ^b	

a: Fisher's exact test; b: $\chi^2 = 0.41$

TABLE II
Distribution of astrovirus, adenovirus and calicivirus positive samples related to years of collection, 2000/2004

Year	Astrovirus		Adenovirus		Calicivirus	
	Positive/total	%	Positive/total	%	Positive/total	%
2000	1/15	6.7	-/15	-	-/15	-
2001	-/12	-	-/12	-	-/12	-
2002	3/63	4.8	1/65	1.5	12/67	17.9
2003	7/244	2.9	14/298	4.7	19/286	6.6
2004	-/20	-	-/25	-	-/26	-
p	0.4349 ^a		0.4876 ^a		0.0034 ^b	

a: Fisher's exact test; b: $\chi^2 = 8.58$

We performed genotypic characterization on the astrovirus samples and found that six samples were HAstV-1, three were HAstV-2 and one was HAstV-4. Co-infection was observed in 10 samples, with five samples testing positive for rotavirus and astrovirus, four samples for rotavirus and adenovirus and one sample for astrovirus and calicivirus.

DISCUSSION

In the present study, the positivity rates for astrovirus and adenovirus were 3.1% and 3.6%, respectively; these detection indices were similar to those previously found in the Central-West region of Brazil (Cardoso et al. 2002, Santos et al. 2007). However, other authors have reported higher detection rates in Brazil (Cardoso et al. 2002, Victoria et al. 2007, Resque et al. 2007). The highest detection rates were observed in epidemic situations (Silva et al. 2001) and, according to Resque et al. (2007), this could reflect socio-economic differences. Globally, detection rates vary from 1.8%-13.9%, depending on the geographical area, as well the socio-economic situation (Jarecki-Khan et al. 1993, Caracciolo et al. 2007, Papaventsis et al. 2008).

The viruses belonging to the *Norovirus* and *Sapovirus* genera of the *Caliciviridae* family infect humans of all ages. They have been detected globally with indexes that vary from 7.3%-23.7% (Marrie-Cardine et al. 2002, Caracciolo et al. 2007). In Brazil, similar to astrovirus and adenovirus, there are few calicivirus detection studies and one of these showed detection rates of 14.5% in Rio de Janeiro (Soares et al. 2007). In the Central-West region, only one study was conducted, which showed a detection index of 8.6% (Borges et al. 2006), similar to that observed in the present study of 7.6%.

In the present work, calicivirus samples were not characterized in terms of calicivirus genera. However, 22 were detected by Ni/E3 or JV12/13 primers and one was detected by Ni/E3 and 289/290 primers. Considering that the first two primer sets were designed to detect norovirus, our results suggest that these samples may belong to this genus. On the other hand, the 289/290 primer pair detects both norovirus and sapovirus, and rotavirus by cross-reactivity (Ludert et al. 2004). In this study, we found eight samples that were positive by this primer set. We did not use additional primers to confirm the presence of calicivirus; therefore it is not possible to conclude to which genera the samples belong. Additional studies utilizing DNA sequencing are in progress in our lab and should address this question.

The detection of astrovirus, adenovirus and calicivirus reveals that infection by these agents is a reality among our infantile population and suggests the possibility of nosocomial transmission, which has been previously observed for rotaviruses (Andreasi et al. 2007). During this study we were not informed about nosocomial outbreaks, however. This is the first study conducted in our state detecting enteric viruses that play a role in the etiology of childhood acute gastroenteritis.

Among the 85 children reporting respiratory complaints, no samples were positive for astrovirus. Conversely, three and seven children with respiratory symp-

toms showed positivity to adenovirus and calicivirus, respectively. Unfortunately, in the present study, serotype identification, which could possibly suggest a cause for the respiratory symptoms, was not performed. These data are in agreement with a study that detected adenovirus in children with acute gastroenteritis and respiratory symptoms (Fodha et al. 2007).

Most of the co-infection cases observed in this study involved the association of one of the three other viruses with group A rotavirus, with one sample presenting an association between astrovirus and calicivirus. The existence of co-infections between gastroenteric viruses makes the determination of the primary etiologic agent, as well as the determination of virus-specific symptoms, difficult (Resque et al. 2007, Victoria et al. 2007).

Astrovirus detection occurred mainly in the first day of diarrhea, a finding similar to the results reported by Gabbay et al. (2007). For adenovirus, the highest detection occurred in the third day, and for calicivirus, the highest positivity rates were observed on or after the fifth day of disease. Astrovirus and adenovirus were detected in similar proportions in children of both genders, while calicivirus predominated in female children. This finding is in agreement with published literature (Santos et al. 2007), although Shimizu et al. (2007) showed a higher detection of adenovirus among male children, and Borges et al. (2006) found no significant differences between genders regarding calicivirus infection.

Regarding the year of sample collection, we observed a higher positivity during the years of 2002 and 2003, with a predominance of calicivirus seen in 2002. This observation should be interpreted carefully, however, because, in the years 2000, 2001 and 2004, the number of samples was lower than the number collected in 2002 and 2003. The three viruses investigated were found to circulate in all months of the year, with no evident detection peak. Furthermore, despite the high occurrence of calicivirus infection in March and April, no statistically significant differences existed as compared to calicivirus infection found in other months of the year. This result is in accordance with those reported previously (Resque et al. 2007).

The results obtained from this study reinforce the need for the establishment of regional vigilance systems to evaluate the impact of enteric viruses on the etiology of viral acute gastroenteritis, especially considering the recent inclusion of the rotavirus vaccine in the childhood immunization calendar.

REFERENCES

- Andreasi MSA, Batista SMF, Tozetti IA, Ozaki CO, Nogueira MM, Fiaccadori FS, Borges AMT, 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. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 411-414.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM E, van der Noordaa J 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: 721-724.
- Caracciolo S, Minini C, Colombrita D, Foresti I, Avolio M, Tosti G, Fiorentini S, Caruso A 2007. Detection of sporadic cases of Norovirus infection in hospitalized children in Italy. *New Microbiol* 30: 49-52.
- Cardoso DDP, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Martins RMB, Leite JPG 2002. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiania, Goiás, Brazil. *Med Sci Monit* 8: 624-628.
- Fodha I, Chouikha A, Dewar J, Trabelsi A, Boujaafar N, Steele AD 2007. Prevalence of adenovirus antigens in children presenting with acute diarrhoea. *Med Trop* 67: 256-258.
- Gabbay YB, Linhares AC, Oliveira DS, Nakamura LS, Mascarenhas JDP, Gusmão RHP, Heinemann MB, Macedo O, Leite JPG 2007. First detection of a human astrovirus type 8 in a child with diarrhea in Belem, Brazil: comparison with other strains worldwide and identification of possible three lineages. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 531-534.
- Girard MP, Steele D, Chagnat CL, Kieny MP 2006. A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine* 24: 2732-2750.
- Green J, Gallimore CI, Norcott JP, Lewis D, Brown DW 1995. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol* 47: 392-398.
- Jakab F, Peterfai J, Meleg E, Banyai K, Mitchell DK, Szucs G 2005. Comparison of clinical characteristics between astrovirus and rotavirus infections diagnosed in 1997 to 2002 in Hungary. *Acta Paediatr* 94: 667-671.
- Jarecki-Khan K, Tzipori SR, Unicomb LE 1993. Enteric adenovirus infection among infants with diarrhea in rural Bangladesh. *J Clin Microbiol* 31: 484-489.
- 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.
- Ludert JE, Alcalá AC, Liprandi F 2004. Prime pair p289-p290, designed to detect both noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR, also detects rotaviruses by cross-reactivity. *J Clin Microbiol* 42: 835-836.
- Marie-Cardine A, Gourlain 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.
- Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 33: 797-801.
- Papaventsis DC, Dove W, Cunliffe NA, Nakagomi O, Combe P, Grosjean P, Hart CA 2008. Human astrovirus gastroenteritis in children, Madagascar, 2004-2005. *Emerg Infect Dis* 14: 844-846.
- Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Andrade ZP, De Castro L 1985. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J Virol Methods* 10: 21-28.
- Resque HR, Munford V, Castilho JG, Schmich H, Caruzo TAR, Racz ML 2007. Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in Sao Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 969-974.
- Santos RAT, Borges AMT, Costa PSS, Teixeira JMS, Giugliano LG, Leite JPG, Cardoso DDP 2007. Astrovirus infection in children living in the Central West region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 209-213.
- Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H 2007. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru City, Japan. *Infect Genet Evol* 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.
- Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MC, Maranhão AG, Rocha LN, Ramirez ML, Monroe SS, Glass RI, Gentsch J 2007. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 13: 1244-1246.
- Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JPG, Miagostovich MP 2007. Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 79: 939-944.
- Vinje J, Altena SA, Koopmans MP 1997. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis* 176: 1374-1378.
- Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 9: 247-262.

OCCURRENCE OF ENTERIC VIRUS IN INSTITUTIONALIZED OLDER
ADULTS FROM CAMPO GRANDE-MS

ENTERIC VIRUS IN INSTITUTIONALIZED OLDER ADULTS

Márcia Sueli Assis Andreasi*, Sonia Maria Fernandes*, Inês Aparecida Tozetti*,
Fabíola Souza Fiaccadori⁺, Ana Maria Tavares Borges⁺, Rodrigo Alessandro Togo
Santos⁺, Gláucia Bigaton[‡], Divina das Dores de Paula Cardoso⁺.

*Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

*Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás,
Goiânia, GO, Brasil.

[‡]Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias. Universidade Federal de Mato
Grosso Sul.

Adress for Correspondence:

Márcia Sueli Assis Andreasi. Departamento de Patologia, Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cidade
Universitária s/n, Bairro Universitário. Campo Grande, MS, Brasil. Caixa Postal 549
CEP 79070-900. msaa@nin.ufms.br

Objectifying to know about viral agents of gastroenteritis in older adults, like as enteric group A Rotavirus, calicivirus, astrovirus and adenovirus, in Campo Grande – MS, Brasil, was made a transversal study in an institution of this city in 2006 and 2007. One hundred fifteen subjects were included in this study and to which, one fecal sample was collected and the questionnaire with personal data and physic conditions was field at the moment with the help of dossier and the people who take care of them. The age range was from 60 to 98 years old. The viral detection was made by different methods regarding the virus type. The adenovirus was detected by immunoenzyme assay (EIA). To rotavirus the research was made by EIA plus polyacrilamide gel electrophoresis (SDS- PAGE), while astrovirus and calicivirus were researched by Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). From 115 samples analyzed, 13 (11.1%) were positive to viral agents and among these, 10 (8.7%), 02 (1.7%) and 01 (0.8%) were positive to calicivirus, adenovirus and astrovirus, respectively. There was no positivity to group A Rotavirus. In spite of this study not regarding the syndrome and outbreaks as important to the population we consider that situations like this can't be despised. Taking into consideration that this is the first study made in Middle-West region from Brazil to detect enteric virus in elderly, the data should be used to improve the standards and the quality of this age group's life.

Key-words: Calicivirus, Astrovirus, Adenovirus, gastroenteritis, older adults.

The life's expectancy of the Brazilian population has increased 20 years, since 1950, achieving the average age of 66 years nowadays with increment of more ten years till 2050. This kind of demographic transformation has some consequences including individual, communitarian, national and international health aspects¹.

With the age, various organic transformations occur, being the equilibrium, mobility, vision, audition and musculature the most affected². There is propensity to psych changes, low esteem and depression³. Still the decline of cellular and humoral immunity what makes easier the risk of infections caused mainly by viral agents⁴.

The gastroenteritis epidemiologic surveillance, in terms of etiologic agent definition, has been an important action to human health contributing to better conditions of sanitation⁵

The importance of different virus, like enteric group A Rotavirus, calicivirus, astrovirus and adenovirus, in the infants gastroenteritis has been established as the circulation of these in asymptomatic children⁶. However, still are few the studies related to occurrence of these viruses in adults, with or no symptoms and mainly in older adults⁷. Group A Rotavirus – Reoviridae family – Rotavirus gender, is admitted as the main agent of child gastroenteritis but not common in adults and almost unknown in the elderly^{7,8}. Considering the adenovirus, Adenoviridae family – Mastadenovirus gender, it is known that this infects adults and that in conditions of immune decay may be opportunist leading to a serious and lethal diseases⁸. The astrovirus, Astroviridae family- Mamastrovirus gender, is considered to also infect adults⁹ in spite of having a not established role as natural infection agent, specially in this population, in specific in older adults. However, the calicivirus, Caliciviridae family - Norovirus gender and Sapovirus, are known for infecting humans of all age

groups, for causing gastroenteritis, for getting epidemics outbreaks¹⁰. Despite of this, still there are few studies related to its circulation in elder adults.

Objectifying to know about these viral agents in older adults, in Campo Grande – MS, was made a transversal study in an institution of this city, where there are 150 older adults. From these, 115 subjects were included in this study and to which, one fecal sample was collected and the questionnaire with personal data and physic conditions was field at the moment with the help of dossier and the people who take care of them, still only with the agreement of the patient. The collection was made in 2006 and 2007, before approved by Ethics committee in research of the Universidade Federal of Mato Grosso do Sul – n° 559. From 115 older adults, 38 were female and 77 male. The age range was from 60 to 98 years old with the average of 77.96 years. The institution is a public entity with deficient conditions, but with separate male and female wings. During the course of the study was not related by the institute's administration any diarrhea outbreak and only two older adults reported diarrhea in the collection time of fecal samples. When the medical attending was necessary, it was made by Sistema Único de Saúde (SUS-MS), not occurring any official surveillance system to this population's health. It is worth reminding, however, that one voluntary doctor attended this population.

The viral detection was made by different methods regarding the virus type. To rotavirus, the research was made by two methods: immunoenzyme assay (EIA) (Ridascreen Rotavírus-R- Biopharm AG, Germany), following the manufacture instruction, and polyacrilamide gel electrophoresis (SDS- PAGE)¹¹, using as compare standards the SA-11 simios sample. The adenovirus also was detected by EIA (Ridascreen Rotavírus-R- Biopharm AG, Germany), while astrovirus and calicivirus were researched by Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction

(RT-PCR). The RNA extractio was performed according to Bomm et al(1900)¹² method, modified by Cardoso et al. (2002)¹³. To obtain the viral cDNA, for both virus, was used the randomic primers pd(N)6 (*Random Hexamer-* Amersham Biosciences) following the described method^{14,15}. The amplification was made using the primers Mon 269/ 270¹⁶, to astrovirus and Ni/E3¹⁷, JV12/13¹⁸ and 289/290¹⁹, to calicivirus. The reaction was performed following the previous described conditions^{14,15}. To compare the obtained fragments was used the molecular pattern 123 pb DNA Ladder (Amersham Biosciences), and in all reactions, positive samples were used to astrovirus and calicivirus, kindly given by Laboratório de Virologia Comparada - FIOCRUZ – RJ. All steps of reaction occurred in separate compartments avoiding contamination.

From 115 samples analyzed, 13 (11.13%) were positive to viral agents and among these, 10 (8.7%), 02 (1.7%) and 01 (0,8%) were positive to calicivirus, adenovirus and astrovirus, respectively. There was no positivity to group A Rotavirus and any older adults showed diarrhea, while samples were collected. The table 01 shows the positive samples for the detected viruses in relation to gender and age.

The non detection of group A Rotavirus in this study is in agreement with the observed by Chen et al (2008)²⁰ in China. Both studies are in accordance with the fact that, although these viruses are the main agents of infantile viral gastroenteritis throughout the world, the affected children could already have had contact with the main genotypes and developed immunity until the age of five; however as they turn out to elderly, they may become susceptible to the viruses again. On the other hand, the high viral circulation among children has caused the continue adults exposition, maintaining the immunologic memory, which is enough to avoid the infection at

least in conditions without epidemic outbreaks. In this situation the studies have shown the detection of this virus type in this population^{21,22}.

The numbers of this study showed high percents of detection to calicivirus which was in accord with the results obtained by Chen et al. (2008)²⁰, though the authors observed slightly higher index. This fact occurred to adenovirus too.

Additionally, the norovirus has been reported in other studies like gastroenteritis agents in militaries and travelers as elderly, especially that are attended in institutions^{23,24}. Despite of this present study did not make definitions for calicivirus gender the data were confirmed by literature.

The definition of adenovirus gender, in two identified samples, in elderly population was not made, however, only the large specter of infections that can be developed by these virus make this result important to public health.

Similarly, the astrovirus has been detected in elderly attended in institutions and no immunocompetent subject²³ and because of this our data add up to literature.

In accord with CDC – USA (Centre of Disease Control), because elderly's low immunity and loss of health, the gastroenteritis can be serious and even lethal. In spite of this study not regarding the syndrome and outbreaks as important to the population we consider that situations like this can't be despised because hard access to this population and the registers aren't true enough.

Taking into consideration that this is the first study made in Middle-West region from Brazil to detect enteric virus in elderly, the data should be used to improve the standards and the quality of this age group's life.

REFERENCES

- 1 Cruz AF, Santos DN. Histórico do curso para cuidadores de idosos. In: Secretaria de Estado de Trabalho, Assistência Social e Economia Solidária do Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. Terceiro Curso de Capacitação para Cuidadores de Idosos. Campo Grande: Programa de Assessoria à Gestão de Política do Idoso/SETASS, 2004, 7-11.
- 2 Paz AA, Santos BRL, Eidt OR. Vulnerabilidade e envelhecimento no contexto da saúde. *Acta Paul Enfer* 2006; 19:338-342.
- 3 Santana AJ, Barbosa Filho JC. Prevalência de sintomas depressivos em idosos institucionalizados na cidade de Salvador. *Rev Baiana de Saúde Pública* 2007; 31:134-146.
- 4 Peres A, Bauer M, Cruz IB et al. Immunophenotyping and T-cell proliferative capacity in a healthy aged population. *Biogerontology* 2003; 4:289-296.
- 5 Caso JAG, Yagü JF, Izquierdo JMC et al. Estudio de um brote epidêmico em uma residência de ancianos. *Atencion Primária* 1996; 17:211-215.
- 6 Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 247-262.
- 7 Anderson EJ, Weber SG. Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:91-99.
- 8 Bishop RF. Natural history of human rotavirus infection. *Arch Virol Suppl* 1996; 12:119-128.
- 9 Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *J Med Virol* 1997; 51:101-106.

- 10 Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS et al. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreak of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 2002; 186: 1-7.
- 11 Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP et al. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J Virol Methods* 1985; 10: 21-28.
- 12 Boom R, Sol CJA, Salimans MMM et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495-503.
- 13 Cardoso DDP, Fiaccadori FS, Souza MBLD et al. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiania, Goiás, Brazil. *Medical Science Monitor* 2002; 8: 624-628.
- 14 Santos RAT, Borges AMT, Costa PSS et al. Astrovirus infection in children living in the Central West region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 209-213.
- 15 Borges AMT, Teixeira JMS, Costa PSS et al. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 721-724. (Borges et al. 2005)
- 16 Noel JS, Lee TW, Kurtz JB et al. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 797-801.
- 17 Green J, Gallimore CI, Norcott JP et al. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol* 1995; 47: 392-398.
- 18 Vinjé J, Altena SA, Koopmans MP. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis* 1997; 176: 1374-1378.

- 19 Jiang X, Espul C, Zhong WM et al. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch Virol* 1999; 144: 2377-2387.
- 20 Chen MF, Gao Y, Cong X et al. Etiological study on sporadic viral gastroenteritis among adult in Beijing. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008; 88:265-267.
- 21 Cubitt WD, Holzel H. An outbreak of rotavirus infection in a long-stay ward of a geriatric hospital. *J Clin Pathol* 1980; 33:306-308.
- 22 Marshall J, Botes J, Gorrie G et al. Rotavirus detection and characterization in outbreaks of gastroenteritis in aged-care facilities. *J Clin Virol* 2003; 28:331-340.
- 23 Lewis DC, Lightfoot NF, Cubitt WD et al. Outbreak of astrovirus type 1 and rotavirus gastroenteritis in a geriatric inpatient population. *J Hosp Infect* 1989; 14:9-
- 24 Gray JJ, Wreghitt TG, Cubitt WD et al. An outbreak of gastroenteritis in a home for the elderly associated with astrovirus type 1 and human calicivirus. *J Med Virol* 1987; 23:377-381.

Table 01- Demographic characteristics of positive older adults in relation to detected virus.

age (years)	Adenovirus		Astrovirus		Calicivirus		Total	
	M	F	M	F	M	F	M	F
61	-	-	-	-	01	-	01	-
67	-	-	-	-	01	-	01	-
72	-	-	-	-	01	-	01	-
73	-	-	-	-	-	01	-	01
74	-	-	-	-	-	01	-	01
75	-	-	-	-	01	-	01	-
77	-	-	01	-	-	01	01	01
79	-	-	-	-	01	-	01	-
84	-	-	-	-	01	-	01	-
85	01	-	-	-	-	-	01	-
96	01	-	-	-	-	-	01	-
Total	02	-	01	-	07	03	10	03

NOTE: M – male; F - female

6- PERSPECTIVAS

Este estudo representou uma iniciativa conjunta da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e da Universidade Federal de Goiás, no sentido de implantar em nossa instituição uma rotina para detecção e caracterização dos vírus entéricos. Esse trabalho de cooperação contribuirá para o desenvolvimento técnico-científico da nossa região, além de implementar as ações de saúde pública e melhorar a qualidade de vida da população de faixa etária mais vulnerável.

Vizando atender a essas perspectivas, pretendemos dar continuidade às atividades de pesquisa com vírus entéricos, estreitar a colaboração interinstitucional e manter a vigilância epidemiológica da circulação viral considerando-se a necessidade de acompanhar o processo vacinal.

7- CONCLUSÕES

- A detecção de astrovírus, calicivírus e adenovírus na população infantil revelou que a infecção por esses agentes é uma realidade nesta população de Mato Grosso do Sul, com possibilidade de transmissão nosocomial.
- Adicionalmente, a detecção viral em idosos institucionalizados sugere necessidade de reforço no acompanhamento dessa população visando prevenção e tratamento.
- A observação da ocorrência de co-infecção na população em estudo reforça não só o fato da circulação viral simultânea como também a preponderância de rotavírus do grupo A no processo da gastroenterite infantil.
- A observação da ocorrência viral nas crianças com até 24 meses de idade reforça o conceito de que as medidas de prevenção devam ser tomadas em idade precoce.
- Consideramos que a não relação da positividade viral em termos de gênero e sintomatologia na população infantil pode ter ocorrido em função da alta e contínua circulação viral na região, o que parece ser reforçado pelo fato de não haver sido observado sazonalidade para os agentes.
- Uma vez que este é o primeiro estudo realizado na região Centro-Oeste no contexto de detecção de vírus entérico em população idosa, os dados devem servir de subsídios para medidas de melhoria de condições de vida dessa faixa etária.
- Finalmente, consideramos que os resultados obtidos com este estudo reforçam a necessidade do estabelecimento de vigilância regional para avaliar o impacto dos vírus entéricos na etiologia da gastroenterite viral, considerando a recente inclusão da vacina para rotavírus do grupo A no calendário de imunização infantil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, F. X., VILLENA, C., *et al.* Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. Appl Environ Microbiol, v.67, n.9, Sep, p.3904-7. 2001.
- ADRIAN, T., HEINRICH, W. COMAP: a comigrating analysis program for estimating the relationship of adenoviruses on the genome level. Nucleic Acids Res, v.14, n.1, Jan 10, p.559-65. 1986.
- ANDREASI, M. S. A., BATISTA, S. M. F., *et al.* Rotavírus A em crianças de até 3 anos de idade, hospitalizadas com gastroenterite aguda em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop, v.40, n.4, p.411-414, jul-ago. 2007.
- ALAM, N. H., ASHRAF, H. Treatment of infectious diarrhea in children. Paediatr Drugs, v.5, n.3, p.151-65. 2003.
- ALLARD, A., ALBINSSON, B., *et al.* Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. J Med Virol, v.37, n.2, Jun, p.149-57. 1992.
- ANDERSON, E. J., WEBER, S. G. Rotavirus infection in adults. Lancet Infect Dis, v.4, n.2, Feb, p.91-9. 2004.
- ANDO, T., MONROE, S. S., *et al.* Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. J Clin Microbiol, v.33, n.1, Jan, p.64-71. 1995.
- ANDO, T., NOEL, JS., *et al.* Genetic classification of "Norwalk-like viruses". J Infect Dis, v.181, p.336-348. 2000.
- APONTE, C., PONCET, D., *et al.* Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. J Virol, v.70, n.2, Feb, p.985-91. 1996.
- APPLETON, H., HIGGINS, P. G. Letter: Viruses and gastroenteritis in infants. Lancet, v.1, n.7919, Jun 7, p.1297. 1975.
- ATMAR, R. L., ESTES, M. K. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. Clin Microbiol Rev, v.14, n.1, Jan, p.15-37. 2001.
- BASS, D. M., QIU, S. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. J Virol, v.74, n.4, Feb, p.1810-4. 2000.
- BASS, D. M., UPADHYAYULA, U. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. J Virol, v.71, n.11, Nov, p.8666-71. 1997.

BELLIOT, G., LAVERAN, H., *et al.* Detection and genetic differentiation of human astrovirus: phylogenetic grouping varies by coding region. Arch Virol, v.142, n.7, p.1323-1334. 1997a.

BELLIOT, G., LAVERAN, H., *et al.* Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. J Med Virol, v.51, n.2, Feb, p.101-6. 1997b.

BELLIOT, G., NOEL, J. S., *et al.* Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of "Norwalk-like viruses". J Clin Microbiol, v.39, n.12, Dec, p.4288-95. 2001.

BERECIARTU, A., BOK, K., *et al.* Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. J Clin Virol, v.25, n.2, Aug, p.197-203. 2002.

BERK, A. J. Adenoviridae: The Viruses and their replication. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. Fields Virology, ed. 5 Lippincott-Williams & Wilkins, v.2, p. 2355-2382. 2007.

BISHOP, D. K. RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. Cell, v.79, n.6, Dec 16, p.1081-92. 1994.

BISHOP, R. F., DAVIDSON, G. P., *et al.* Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet, v.2, n.7841, Dec 8, p.1281-3. 1973.

BON, F., AMBERT-BALAY, K., *et al.* Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. J Clin Microbiol, v.43, n.9, Sep, p.4659-64. 2005.

BORGES, A. M. T. T., SÓCRATES, J. M., *et al.* Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.101, n.7, November, p.721-724. 2006.

BRASIL. Informe Técnico. Doença diarréica por rotavírus: vigilância epidemiológica e prevenção pela vacina oral de rotavírus humano (VORH). Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. 2005.

BRESEE, J. S., GLASS, R. I., *et al.* Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. Vaccine, v.17, n.18, May 4, p.2207-22. 1999.

CAMAROTA, S. C., DE AZEVEDO MDA, S., *et al.* [The occurrence of rotaviruses and adenoviruses in children up to 11 years old without diarrheal symptomatology in Goiania, Goias]. Rev Soc Bras Med Trop, v.25, n.1, Jan-Mar, p.31-5. 1992.

- CARACCIOLO, S., MININI, C., *et al.* Detection of sporadic cases of Norovirus infection in hospitalized children in Italy. New Microbiol, v.30, n.1, Jan, p.49-52. 2007.
- CARDOSO, D. D. P., FIACCADORI, F.S., *et al.* Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiania, Goiás, Brazil. Medical Science Monitor, v. 8, p.624-628. 2002
- CARDOSO, D. D. P., SOARES, C. M. A., *et al.* Serotypes and subgroups of rotavirus isolated from children in central Brazil. Journal of Health Population and Nutrition, v.18, n.1, Jun, p.39-43. 2000.
- CARDOSO, D. D. P., SOARES, C. M. A., *et al.* Epidemiological features of rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.98, n.1, Jan, p.25-29. 2003.
- CARDOSO, D. D. P., RÁCZ, M. L., *et al.* Genotyping of group A rotavirus samples from Brazilian children by probe hybridization. Braz J Med Biol Res, v. 34, n.4, p.471-473, Apr. 2001.
- CARDOSO, D. D. P., MARTINS, R. M. B., *et al.* Rotavirus and adenovirus in children 0-5 years of age with or without gastroenteritis in hospitals from Goiânia - GO, Brazil. Rev Inst Med Trop de São Paulo, v, 34, p. 433-439. 1992.
- CASO, J. A. G., YAGÜ, J. F., Izquierdo JMC *et al.* Estudio de um brote epidêmico em uma residência de ancianos. Atencion Primária; v.17, p. 211-215. 1996.
- CASTILHO, J. G., MUNFORD, V., *et al.* Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in Sao Paulo State, Brazil. J Clin Microbiol, v.44, n.11, Nov, p.3947-53. 2006.
- CHEN, R., NEILL, J. D., *et al.* X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.21, May 23, p.8048-53. 2006.
- CHIBA, S., SAKUMA, Y., *et al.* An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. J Med Virol, v.4, n.4, p.249-54. 1979.
- CHIKHI-BRACHET, R., BON, F., *et al.* Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. J Clin Microbiol, v.40, n.11, Nov, p.4266-72. 2002.
- CHRIS, A. Norwalk-like viruses: when the runs can slow you down. CMAJ, v.168, n.1, Jan 7, p.64-5. 2003.
- CIARLET, M., ESTES, M. K. Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. Curr Opin Microbiol, v.4, n.4, Aug, p.435-41. 2001.
- COLOMBA, C., DE GRAZIA, S., *et al.* Viral gastroenteritis in children hospitalised in Sicily, Italy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, v.25, n.9, Sep, p.570-5. 2006.
- COOK, N., MYINT, S. Astroviruses. J Med Microbiol, v.42, n.1, Jan, p.1-2. 1995.

COSTA, P. S. S., GRISI, S. J. F. E., *et al.* Manifestações clínicas e epidemiológicas das infecções por *Rotavirus A*. Pediatria, v.26, p.151-158. 2004.

COX, G. J., MATSUI, S. M., *et al.* Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. Gastroenterology, v.107, n.5, Nov, p.1398-407. 1994.

CRUZ, J. R., BARTLETT, A. V., *et al.* Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. J Clin Microbiol, v.30, n.5, May, p.1140-4. 1992.

CRUZ, J. R., CACERES, P., *et al.* Adenovirus types 40 and 41 and rotaviruses associated with diarrhea in children from Guatemala. J Clin Microbiol, v.28, n.8, Aug, p.1780-4. 1990.

CUBITT, W. D., MCSWIGGAN, D. A., *et al.* Winter vomiting disease caused by calicivirus. J Clin Pathol, v.32, n.8, Aug, p.786-93. 1979.

CUBITT, W. D., MITCHELL, D. K., *et al.* Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. J Med Virol, v.57, n.3, Mar, p.313-21. 1999.

CUNLIFFE, N. A., DOVE, W., *et al.* Detection and characterisation of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. J Med Virol, v.67, n.4, Aug, p.563-6. 2002.

CURTIS S, G. W., WESTMORELAND, D. An outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 37. J Med Microbiol, v.47, p.91-94. 1998.

DAVISON, A. J., BENKO, M., *et al.* Genetic content and evolution of adenoviruses. J Gen Virol, v.84, n.Pt 11, Nov, p.2895-908. 2003.

DE JONG, J. C., BIJLSMA, K., *et al.* Detection, typing, and subtyping of enteric adenoviruses 40 and 41 from fecal samples and observation of changing incidences of infections with these types and subtypes. J Clin Microbiol, v.31, n.6, Jun, p.1562-9. 1993.

DENNO, D. M., ESTAPE, J. R., *et al.* Etiology of diarrheae in pediatric outpatient settings. Pediatr Infect Dis J, v.24, p.142-148. 2005

DOAN, L. T., OKITSU, S., *et al.* Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. J Med Virol, v.69, n.4, Apr, p.588-94. 2003.

DOLIN, R., BLACKLOW, N. R., *et al.* Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. Proc Soc Exp Biol Med, v.140, n.2, Jun, p.578-83. 1972.

- DOLIN, R., LEVY, A. G., *et al.* Viral gastroenteritis induced by the Hawaii agent. Jejunal histopathology and serologic response. Am J Med, v.59, n.6, Dec, p.761-8. 1975.
- ENGLER, J. A., HONG, J. S. Characterization of the adenovirus fiber protein. Methods Mol Med, v.131, p.281-98. 2007.
- ESPUL, C., MARTINEZ, N., *et al.* Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. J Med Virol, v.72, n.1, Jan, p.75-82. 2004.
- ESTES, M. K., COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. Microbiol Rev, v.53, n.4, Dec, p.410-49. 1989.
- ESTES, M. K., KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. Fields Virology, ed. 5 Lippincott-Williams & Wilkins, v.2, p.1917-1957. 2007.
- FANKHAUSER, R. L., MONROE, S. S., *et al.* Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. J Infect Dis, v.186, n.1, Jul 1, p.1-7. 2002.
- FARKAS, T., ZHONG, W. M., *et al.* Genetic diversity among sapoviruses. Arch Virol, v.149, n.7, Jul, p.1309-23. 2004.
- FARTHING, M. J. Diarrhoea: a significant worldwide problem. Int J Antimicrob Agents, v.14, n.1, Feb, p.65-9. 2000.
- FERNANDES, J. V., FONSECA, S. M., *et al.* Rotavirus detection in feces of children with acute diarrhea. J Pediatr (Rio J), v.76, n.4, Jul-Aug, p.300-4. 2000.
- FLEWETT, T. H. Diagnosis of enteritis virus. Proc R Soc Med, v.69, n.9, Sep, p.693-6. 1976.
- FLOMENBERG, P., GUTIERREZ, E., *et al.* Detection of adenovirus DNA in peripheral blood mononuclear cells by polymerase chain reaction assay. J Med Virol, v.51, n.3, Mar, p.182-8. 1997.
- FODHA, I., CHOUIKHA, A., *et al.* Prevalence of adenovirus antigens in children presenting with acute diarrhoea. Med Trop (Mars), v.67, n.3, Jun, p.256-8. 2007.
- FORD-JONES, E. L., MINDORFF, C. M., *et al.* The incidence of viral-associated diarrhea after admission to a pediatric hospital. Am J Epidemiol, v.131, n.4, Apr, p.711-8. 1990.
- FROGGATT, P. C., BARRY VIPOND, I., *et al.* Surveillance of norovirus infection in a study of sporadic childhood gastroenteritis in South West England and South Wales, during one winter season (1999-2000). J Med Virol, v.72, n.2, Feb, p.307-11. 2004.

FUKUDA, S., KUWAYAMA, M., *et al.* Molecular epidemiology of subgenus F adenoviruses associated with pediatric gastroenteritis during eight years in Hiroshima Prefecture as a limited area. Arch Virol, v.151, n.12, Dec, p.2511-7. 2006.

GALLIMORE, C. I., TAYLOR, C., *et al.* Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. J Clin Microbiol, v.43, n.8, Aug, p.3890-4. 2005.

GABBAY, Y. B., LINHARES, A.C. Prevalence of human astrovirus genotypes associated with acute gastroenteritis among children in Belém, Brazil. Journal of Medical Virology, v.79, p.530-538. 2007.

GARY, G. W., JR., HIERHOLZER, J. C., *et al.* Characteristics of noncultivable adenoviruses associated with diarrhea in infants: a new subgroup of human adenoviruses. J Clin Microbiol, v.10, n.1, Jul, p.96-103. 1979.

GAYDOS, C. A., GAYDOS, J. C. Adenovirus vaccines in the U.S. military. Mil Med, v.160, n.6, Jun, p.300-4. 1995.

GENTSCH, J. R., GLASS, R. I., *et al.* Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, v.30, n.6, Jun, p.1365-73. 1992.

GINSBERG, H. S. The life and times of adenoviruses. Adv Virus Res, v.54, p.1-13. 1999.

GIORDANO, M. O., MARTINEZ, L. C., *et al.* Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. AIDS Res Hum Retroviruses, v.15, n.16, Nov 1, p.1427-32. 1999.

GLASS, R. I., BRESEE, J., *et al.* Gastroenteritis viruses: an overview. Novartis Found Symp, v.238, p.5-19; discussion 19-25. 2001.

GLASS, R. I., NOEL, J., *et al.* The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. Arch Virol Suppl, v.12, p.287-300. 1996.

GLASS, R. I., NOEL, J., *et al.* The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. J Infect Dis, v.181 Suppl 2, May, p.S254-61. 2000.

GOLDING, J., EMMETT, P. M., *et al.* Gastroenteritis, diarrhoea and breast feeding. Early Hum Dev, v.49 Suppl, Oct 29, p.S83-103. 1997.

GONZALEZ, R. A., TORRES-VEGA, M. A., *et al.* In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. Arch Virol, v.143, n.5, p.981-96. 1998.

GOUVEA, V., GLASS, R. I., *et al.* Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. J Clin Microbiol, v.28, n.2, Feb, p.276-82. 1990.

- GRAY, J. J., WREGHITT, T. G., *et al.* An outbreak of gastroenteritis in a home for the elderly associated with astrovirus type 1 and human calicivirus. J Med Virol, v.23, n.4, Dec, p.377-81. 1987.
- GREEN, J., GALLIMORE, C. I., *et al.* Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. J Med Virol, v.47, n.4, Dec, p.392-8. 1995.
- GREEN, K. Y. Caliciviridae: The Noroviruses. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. Fields Virology, ed. 5 Lippincott-Williams & Wilkins, v.1, p.949-971. 2007.
- GREENBERG, H. B., MATSUI, S. M. Astroviruses and caliciviruses: emerging enteric pathogens. Infect Agents Dis, v.1, n.2, Apr, p.71-91. 1992.
- GREENBERG, H. B., WYATT, R. G., *et al.* Solid-phase microtiter radioimmunoassay for detection of the Norwalk strain of acute nonbacterial, epidemic gastroenteritis virus and its antibodies. J Med Virol, v.2, n.2, p.97-108. 1978.
- GRIMM, A. C., CASHDOLLAR, J. L., *et al.* Development of an astrovirus RT-PCR detection assay for use with conventional, real-time, and integrated cell culture/RT-PCR. Can J Microbiol, v.50, n.4, Apr, p.269-78. 2004.
- GRIMWOOD, K., CARZINO, R., *et al.* Patients with enteric adenovirus gastroenteritis admitted to an Australian pediatric teaching hospital from 1981 to 1992. J Clin Microbiol, v.33, n.1, Jan, p.131-6. 1995.
- GUIX, S., BOSCH, A., *et al.* Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells. Virology, v.319, n.2, Feb, p.249-261. 2004.
- GUIX, S., CABALLERO, S., *et al.* Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication. Virology, v.333, n.1, Mar, p.124-131. 2005.
- GUIX, S., CABALLERO, S., *et al.* Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. J Clin Microbiol, v.40, n.1, Jan, p.133-9. 2002.
- GUO, M., QIAN, Y., *et al.* Expression and self-assembly in baculovirus of porcine enteric calicivirus capsids into virus-like particles and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for antibody detection in swine. J Clin Microbiol, v.39, n.4, Apr, p.1487-93. 2001.
- HEDBERG, C. W., OSTERHOLM, M. T. Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. Clin Microbiol Rev, v.6, n.3, Jul, p.199-210. 1993.
- HEDLUND, K. O., RUBILAR-ABREU, E., *et al.* Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994-1998. J Infect Dis, v.181 Suppl 2, May, p.S275-80. 2000.
- HERRMANN, J. E., TAYLOR, D. N., *et al.* Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. N Engl J Med, v.324, n.25, Jun 20, p.1757-60. 1991.

HIERHOLZER, J. C. Adenoviruses in the immunocompromised host. Clin Microbiol Rev, v.5, n.3, Jul, p.262-74. 1992.

HIERHOLZER, J. C., ADRIAN, T., *et al.* Analysis of antigenically intermediate strains of subgenus B and D adenoviruses from AIDS patients. Arch Virol, v.103, n.1-2, p.99-115. 1988.

HILLEMANN, M. R., WERNER, J. H. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. Proc Soc Exp Biol Med, v.85, n.1, Jan, p.183-8. 1954.

HONMA, S., NAKATA, S., *et al.* JIANG, X., HUANG, P. W., *et al.* Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. J Virol Methods, v.83, n.1-2, Dec, p.145-54. 1999.

HUNG, T., CHEN, G. M., *et al.* Seroepidemiology and molecular epidemiology of the Chinese rotavirus. Ciba Found Symp, v.128, p.49-62. 1987.

HUSSAIN, M. A., COSTELLO, P., *et al.* Comparison of primer sets for detection of fecal and ocular adenovirus infection using the polymerase chain reaction. J Med Virol, v.49, n.3, Jul, p.187-94. 1996.

ITURRIZA-GOMARA, M., GREEN, J., *et al.* Molecular epidemiology of human group A rotavirus infections in the United Kingdom between 1995 and 1998. J Clin Microbiol, v.38, n.12, Dec, p.4394-401. 2000.

JAKAB, F., WALTER, J. E., *et al.* Molecular characterization and sequence analysis of human astroviruses circulating in Hungary. FEMS Immunol Med Microbiol, v.39, n.2, Nov 28, p.97-102. 2003.

JARECKI-KHAN, K., TZIPORI, S. R., *et al.* Enteric adenovirus infection among infants with diarrhea in rural Bangladesh. J Clin Microbiol, v.31, n.3, Mar, p.484-9. 1993.

JIANG, B., MONROE, S. S., *et al.* RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.22, Nov 15, p.10539-43. 1993.

JIANG, X., HUANG, P. W., *et al.* Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. J Virol Methods, v.83, n.1-2, Dec, p.145-54. 1999.

KAFETZIS, D. A., MALTEZOU, H. C., *et al.* Epidemiology, clinical course and impact on hospitalization costs of acute diarrhea among hospitalized children in Athens, Greece. Scand J Infect Dis, v.33, n.9, p.681-5. 2001.

KAPIKIAN, A. Z. A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhoea of infants and young children: development, utilization and withdrawal. Novartis Found Symp, v.238, p.153-71; discussion 171-9. 2001.

- KAPIKIAN, A. Z., WYATT, R. G., *et al.* Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. J Virol, v.10, n.5, Nov, p.1075-81. 1972.
- KAPLAN, J. E., FELDMAN, R., *et al.* The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. Am J Public Health, v.72, n.12, Dec, p.1329-32. 1982.
- KELKAR, S. D., ZADE, J. K. Group B rotaviruses similar to strain CAL-1, have been circulating in Western India since 1993. Epidemiol Infect, v.132, n.4, Aug, p.745-9. 2004.
- KINCHINGTON, P. R., ROMANOWSKI, E. G., *et al.* Prospects for adenovirus antivirals. J Antimicrob Chemother, v.55, n.4, Apr, p.424-9. 2005.
- KOCI, M. D., MOSER, L. A., *et al.* Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. J Virol, v.77, n.21, Nov, p.11798-808. 2003.
- KOMORIYA, T., KOHNO, H., *et al.* The development of sensitive latex agglutination tests for detecting astroviruses (serotypes 1 and 3) from clinical stool specimen. Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi, v.13, n.2, p.103-14. 2003.
- KOOPMANS, M., VON BONSDORFF, C. H., *et al.* Foodborne viruses. FEMS Microbiol Rev, v.26, n.2, Jun, p.187-205. 2002.
- KOSULIN, K., HABERLER, C., *et al.* Investigation of adenovirus occurrence in pediatric tumor entities. J Virol, v.81, n.14, Jul, p.7629-35. 2007.
- KURTZ, J. B., LEE, T. W. Astroviruses: human and animal. Ciba Found Symp, v.128, p.92-107. 1987.
- KURTZ, J. B., LEE, T. W., *et al.* Astrovirus infection in volunteers. J Med Virol, v.3, n.3, p.221-30. 1979.
- LARRANAGA, C., KAJON, A., *et al.* Adenovirus surveillance on children hospitalized for acute lower respiratory infections in Chile (1988-1996). J Med Virol, v.60, n.3, Mar, p.342-6. 2000.
- LEBARON, C. W., NAVID P. FURUTAN, *et al.* Viral Agents of Gastroenteritis Public Health Importance and Outbreak Management MMWR, v.39, n.RR-51, p.1-24 1990.
- LEE, T. W., KURTZ, J. B. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. Epidemiol Infect, v.112, n.1, Feb, p.187-93. 1994.
- LEE, T. W., KURTZ, J. B. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. J Gen Virol, v.57, n.Pt 2, Dec, p.421-4. 1981.

LEITE, J. P., BARTH, O. M., *et al.* Astrovirus in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.86, n.4, Oct-Dec, p.489-90. 1991.

LEWIS, T. L., GREENBERG, H. B., *et al.* Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. J Virol, v.68, n.1, Jan, p.77-83. 1994.

LI, L., PHAN, T. G., *et al.* Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. Microbiol Immunol, v.49, n.2, p.121-8. 2005.

LIN, H. C., KAO, C. L., *et al.* Enteric adenovirus infection in children in Taipei. J Microbiol Immunol Infect, v.33, n.3, Sep, p.176-80. 2000.

LOGAN, C., O'LEARY, J. J., *et al.* Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. J Clin Microbiol, v.44, n.9, Sep, p.3189-95. 2006.

LUKASHOV, V. V., GOUDSMIT, J. Evolutionary relationships among Astroviridae. J Gen Virol, v.83, n.Pt 6, Jun, p.1397-405. 2002.

LUNDGREN, O., SVENSSON, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. Microbes Infect, v.3, n.13, Nov, p.1145-56. 2001.

MADELEY, C. R., COSGROVE, B. P. Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. Lancet, v.2, n.7932, Sep 6, p.451-2. 1975a.

MADELEY, C. R., COSGROVE, B. P. Letter: Viruses in infantile gastroenteritis. Lancet, v.2, n.7925, Jul 19, p.124. 1975b.

MAGALHÃES, G. F., NOGUEIRA, P. A., *et al.* Rotavirus and adenovirus in Rondônia. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.102, n.5, Aug, p.557-557. 2007.

MANSELL, E. A., PATTON, J. T. Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. J Virol, v.64, n.10, Oct, p.4988-96. 1990.

MARIE-CARDINE, A., GOURLAIN, K., *et al.* Epidemiology of acute viral gastroenteritis in children hospitalized in Rouen, France. Clin Infect Dis, v.34, n.9, May 1, p.1170-8. 2002.

MARSHALL, J. A., BRUGGINK, L. D., *et al.* Molecular features of astrovirus associated with a gastroenteritis outbreak in an aged-care centre. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, v.26, n.1, Jan, p.67-71. 2007.

MATSUI, S. M., GREENBERG, H. B. Immunity to calicivirus infection. J Infect Dis, v.181, p.331-3335. 2000.

MATSUI, S. M., KIANG, D., *et al.* Molecular biology of astroviruses: selected highlights. Novartis Found Symp, v.238, p.219-33; discussion 233-6. 2001.

- MATTICK, K. L., GREEN, J., *et al.* The heteroduplex mobility assay (HMA) as a pre-sequencing screen for Norwalk-like viruses. J Virol Methods, v.87, n.1-2, Jun, p.161-9. 2000.
- MAUNULA, L., KALSO, S., *et al.* Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. Epidemiol Infect, v.132, n.4, Aug, p.737-43. 2004.
- MEEROFF, J. C., SCHREIBER, D. S., *et al.* Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. Ann Intern Med, v.92, n.3, Mar, p.370-3. 1980.
- MENDEZ, E., AGUIRRE-CRESPO, G., *et al.* Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. J Virol, v.81, n.19, Oct, p.10649-58. 2007.
- MENDEZ, E., ARIAS, C. F. Astroviruses. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. Fields Virology, ed. 5 Lippincott-Williams & Wilkins, v.1, p.982-997. 2007.
- MENDEZ, E., FERNANDEZ-LUNA, T., *et al.* Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. J Virol, v.76, n.16, Aug, p.7996-8002. 2002.
- MENDEZ, E., SALAS-OCAMPO, M. P., *et al.* Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. J Virol, v.77, n.21, Nov, p.11378-84. 2003.
- MENDEZ-TOSS, M., GRIFFIN, D. D., *et al.* Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. J Clin Microbiol, v.42, n.1, Jan, p.151-7. 2004.
- MENDEZ-TOSS, M., ROMERO-GUIDO, P., *et al.* Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. J Gen Virol, v.81, n.Pt 12, Dec, p.2891-7. 2000.
- MITCHELL, D. K. Astrovirus gastroenteritis. Pediatr Infect Dis J, v.21, n.11, Nov, p.1067-9. 2002.
- MITCHELL, D. K., MATSON, D. O., *et al.* Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers. J Infect Dis, v.180, n.2, Aug, p.514-7. 1999.
- MONROE, S. S., JIANG, B., *et al.* Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. J Virol, v.67, n.6, Jun, p.3611-4. 1993.
- MONROE, S. S., STINE, S. E., *et al.* Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. J Virol, v.65, n.2, Feb, p.641-8. 1991.
- MUNOZ, F. M., PIEDRA, P. A., *et al.* Disseminated adenovirus disease in immunocompromised and immunocompetent children. Clin Infect Dis, v.27, n.5, Nov, p.1194-200. 1998.

MUSTAFA, H., PALOMBO, E. A., *et al.* 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, v.38, n.3, Mar, p.1058-62. 2000.

MUSTAFA, H., PALOMBO, E. A., *et al.* Improved sensitivity of astrovirus-specific RT-PCR following culture of stool samples in CaCo-2 cells. J Clin Virol, v.11, n.2, Aug 20, p.103-7. 1998.

NAKAGOMI, T., CORREIA, J. B., *et al.* Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. Arch Virol, v.153, n.5, May, p.957-60. 2008.

NAKATA, S., KOGAWA, K., *et al.* The Epidemiology of human calicivirus/Sapporo/82/Japan. Arch Virol Suppl, v.12, p.263-70. 1996.

NAKATA, S., HONMA, S., *et al.* Prevalence of human calicivirus infections in Kenya as determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. J Clin Microbiol, v.36, n.11, Nov, p.3160-3. 1998.

NAKATA, S., PETRIE, B. L., *et al.* Electron microscopy procedure influences detection of rotaviruses. J Clin Microbiol, v.25, n.10, Oct, p.1902-6. 1987.

NOEL, J. S., LEE, T. W., *et al.* Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. J Clin Microbiol, v.33, n.4, Apr, p.797-801. 1995.

NOEL, J., MANSOOR, A., *et al.* Identification of adenoviruses in faeces from patients with diarrhoea at the Hospitals for Sick Children, London, 1989-1992. J Med Virol, v.43, n.1, May, p.84-90. 1994.

NOZAWA, C. M., VAZ, M. G., *et al.* Detection of astrovirus-like in diarrhoeic stool and its coexistence with rotavirus. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.27, n.5, Sep-Oct, p.238-41. 1985.

OH, D., SCHREIER, E. Molecular characterization of human astroviruses in Germany. Arch Virol, v.146, n.3, p.443-55. 2001.

OH, D. Y., GAEDICKE, G., *et al.* Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity. J Med Virol, v.71, n.1, Sep, p.82-93. 2003.

OISHI, I., YAMAZAKI, K., *et al.* A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. J Infect Dis, v.170, n.2, Aug, p.439-43. 1994.

OKADA, J., KOBAYASHI, N., *et al.* Analysis on reassortment of rotavirus NSP1 genes lacking coding region for cysteine-rich zinc finger motif. Arch Virol, v.144, n.2, p.345-53. 1999.

- OKITSU-NEGISHI, S., NGUYEN, T. A., *et al.* Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. Pediatr Int, v.46, n.2, Apr, p.245-52. 2004.
- OLIVEIRA, C. S., LINHARES, A. C. Rotavirus: clinical features and prevention. J Pediatr, v.1, p.S91-S102. 1999.
- ORLANDI, P. P., MAGALHAES, G. F., *et al.* Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). Braz J Med Biol Res, v.39, n.4, Apr, p.507-17. 2006.
- PALOMBO, E. A., BISHOP, R. F. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. J Clin Microbiol, v.34, n.7, Jul, p.1750-3. 1996.
- PANG, X. L., HONMA, S., *et al.* Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. J Infect Dis, v.181 Suppl 2, May, p.S288-94. 2000.
- PARASHAR, U. D., DOW, L., *et al.* An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers. Epidemiol Infect, v.121, n.3, Dec, p.615-21. 1998.
- PARASHAR, U. D., LI, J. F., *et al.* Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. J Infect Dis, v.190, n.6, Sep 15, p.1088-92. 2004.
- PARRINO, T. A., SCHREIBER, D. S., *et al.* Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. N Engl J Med, v.297, n.2, Jul 14, p.86-9. 1977.
- PATTON, J. T., CHEN, D. RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores. J Virol, v.73, n.2, Feb, p.1382-91. 1999.
- PEREIRA FILHO, E., DA COSTA FARIA, N. R., *et al.* Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. J Med Microbiol, v.56, n.Pt 3, Mar, p.313-9. 2007.
- PEREIRA, H. G., AZEREDO, R. S., *et al.* Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.78, n.4, Oct-Dec, p.483-90. 1983.
- PIZARRO, J. L., SANDINO, A. M., *et al.* Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. J Gen Virol, v.72 (Pt 2), Feb, p.325-32. 1991.
- PÖNKÄ, A., MAUNULA, L., *et al.* An outbreak of calicivirus associated with consumption of frozen raspberries. Epidemiol Infect, v.123, n.3, Dec, p.469-74. 1999.
- QIÃO, H., NILSSON, M., *et al.* Viral diarrhea in children in Beijing, China. J Med Virol, v.57, n.4, Apr, p.390-6. 1999.

- RÁCZ, M. L. Diagnóstico laboratorial das infecções virais. In: TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. Microbiologia, ed.5 São Paulo, Atheneu, p.581-592.2008.
- REITHER, K., IGNATIUS, R., *et al.* Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics. BMC Infect Dis, v.7, p.104. 2007.
- RIBEIRO, L. R., GIUBERTI, R. S., *et al.* Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.103, n.2, Mar, p.201-6. 2008.
- RICHARDS, A. F., LOPMAN, B., *et al.* Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. J Clin Virol, v.26, n.1, Jan, p.109-15. 2003.
- RODRIGUEZ-BAEZ, N., O'BRIEN, R., *et al.* Astrovirus, adenovirus, and rotavirus in hospitalized children: prevalence and association with gastroenteritis. J Pediatr Gastroenterol Nutr, v.35, n.1, Jul, p.64-8. 2002.
- ROWE, W. P., HUEBNER, R. J., *et al.* Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med, v.84, n.3, Dec, p.570-3. 1953.
- RUSSELL, W. C. Update on adenovirus and its vectors. J Gen Virol, v.81, n.Pt 11, Nov, p.2573-604. 2000.
- RUUSKANEN, O., Meurman, O., AKUSJARV, G. Adenoviruses. In: Richman, D.D., Whitley, R.J., Hayden, F.G. Clin, Virol. Churchill, Livingstone, 1977. p.525-547.
- RUX, J. J., BURNETT, R. M. Adenovirus structure. Hum Gene Ther, v.15, n.12, Dec, p.1167-76. 2004.
- SAIR, A. I., D'SOUZA, D. H., *et al.* Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. J Virol Methods, v.100, n.1-2, Feb, p.57-69. 2002.
- SAKAMOTO, T., NEGISHI, H., *et al.* Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). J Med Virol, v.61, n.3, Jul, p.326-31. 2000.
- SAN MARTIN, C., BURNETT, R. M. Structural studies on adenoviruses. Curr Top Microbiol Immunol, v.272, p.57-94. 2003.
- SANCHEZ-FAUQUIER, A., CARRASCOSA, A. L., *et al.* Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. Virology, v.201, n.2, Jun, p.312-20. 1994.
- SANEKATA, T., AHMED, M. U., *et al.* Human group B rotavirus infections cause severe diarrhea in children and adults in Bangladesh. J Clin Microbiol, v.41, n.5, May, p.2187-90. 2003.

SANTOS, N. S. O. Viroses entéricas. In: SANTOS, N. S. O., ROMANOS, M. T. V., *et al.* Introdução a Virologia Humana, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 59-74, 2002.

SANTOS, N., VOLOTAO, E. M., *et al.* VP7 gene polymorphism of serotype G9 rotavirus strains and its impact on G genotype determination by PCR. Virus Res, v.90, n.1-2, Dec, p.1-14. 2002.

SANTOS, N., VOLOTAO, E. M., *et al.* Surveillance of rotavirus strains in Rio de Janeiro, Brazil, from 1997 to 1999, Journal of Clinical Microbiology, v.7, p. 3399-3402. 2003.

SANTOS REAT, BORGES AMT, CARDOSO DDP *et al.* Astrovirus infection in children living in the Central West region of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.102, Nov, p.209-213. 2007.

SCHNAGL, R. D., BELFRAGE, K., *et al.* Incidence of human astrovirus in central Australia (1995 to 1998) and comparison of deduced serotypes detected from 1981 to 1998. J Clin Microbiol, v.40, n.11, Nov, p.4114-20. 2002.

SCHNURR, D., BOLLEN, A., *et al.* Adenovirus mixture isolated from the brain of an AIDS patient with encephalitis. J Med Virol, v.47, n.2, Oct, p.168-71. 1995.

SEBIRE, N. J., MALONE, M., *et al.* Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. J Clin Pathol, v.57, n.9, Sep, p.1001-3. 2004.

SHIMIZU, H., PHAN, T. G., *et al.* An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru City, Japan. Infect Genet Evol, v.7, n.2, Mar, p.279-84. 2007.

SHIMIZU, M., SHIRAI, J., *et al.* Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. J Clin Microbiol, v.28, n.2, Feb, p.201-6. 1990.

SILVA, A. M., LEITE, E. G., *et al.* An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 in a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.96, n.8, Nov, p.1069-73. 2001.

SILVA, P. A., CARDOSO, D. D., *et al.* Molecular characterization of human astroviruses isolated in Brazil, including the complete sequences of astrovirus genotypes 4 and 5. Arch Virol, v.151, n.7, Jul, p.1405-17. 2006.

SINGH, P. B., SREENIVASAN, M. A., *et al.* Viruses in acute gastroenteritis in children in Pune, India. Epidemiol Infect, v.102, n.2, Apr, p.345-53. 1989.

SOARES, C. C., SANTOS, N., *et al.* Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. Emerg Infect Dis, v.13, n.8, Aug, p.1244-6. 2007.

SOARES, C. C., VOLOTAO, E. M., *et al.* Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. J Clin Virol, v.23, n.3, Jan, p.171-7. 2002.

STEWIEN, K. E., DURIGON, E. L., *et al.* Occurrence of human astrovirus in Sao Paulo City, Brazil. Rev Saude Publica, v.25, n.2, Apr, p.157-8. 1991.

SWENSON, P. D., LOWENS, M. S., *et al.* Adenovirus types 2, 8, and 37 associated with genital infections in patients attending a sexually transmitted disease clinic. J Clin Microbiol, v.33, n.10, Oct, p.2728-31. 1995.

TAI, J. H., EWERT, M. S., *et al.* Development of a rapid method using nucleic acid sequence-based amplification for the detection of astrovirus. J Virol Methods, v.110, n.2, Jun 30, p.119-27. 2003.

TANAKA, H., KISIELIUS, J. J., *et al.* Intrafamilial outbreak of astrovirus gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil. J Diarrhoeal Dis Res, v.12, n.3, Sep, p.219-21. 1994.

TARAPOREWALA, Z., CHEN, D., *et al.* Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. J Virol, v.73, n.12, Dec, p.9934-43. 1999.

TAYLOR, M. B., WALTER, J., *et al.* Characterisation of a South African human astrovirus as type 8 by antigenic and genetic analyses. J Med Virol, v.64, n.3, Jul, p.256-61. 2001.

TIMENETSKY MDO, C., KISIELIUS, J. J., *et al.* Rotavirus, adenovirus, astrovirus, calicivirus and small round virus particles in feces of children with and without acute diarrhea, from 1987 to 1988, in the greater Sao Paulo. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.35, n.3, May-Jun, p.275-80. 1993.

TOPOROVISKI, M. S., CHIEFFI, P. P. *et al.* Diarréia aguda em crianças menores de 3 anos de idade: recuperação de enteropatógenos nas amostras fecais de pacientes comparada à de grupo controle. Jornal de Pediatria, v.72, n.2, p.97-104. 1999.

TRENTIN, J. J., YABE, Y., *et al.* The quest for human cancer viruses. Science, v.137, Sep 14, p.835-41. 1962.

TREVINO, M., PRIETO, E., *et al.* Diarrhea caused by adenovirus and astrovirus in hospitalized immunodeficient patients. Enferm Infec Microbiol Clin, v.19, n.1, Jan, p.7-10. 2001.

UHNOO, I., WADELL, G., *et al.* Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. J Clin Microbiol, v.20, n.3, Sep, p.365-72. 1984.

VAINIO, K., GRUDE, N. Calicivirus and acute gastroenteritis. Tidsskr Nor Laegeforen, v.122, n.27, Nov 10, p.2602-4. 2002.

- VAN REGENMORTEL, M. H.V., MAHY, B. W. J. Emerging issue in virus taxonomy. Emerg Infect Dis, v.10, n.1, Jan, p.8-13. 2004.
- VELAZQUEZ, F. R., MATSON, D. O., *et al.* Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. J Infect Dis, v.182, n.6, Dec, p.1602-9. 2000.
- VELLINGA, J., VAN DER HEIJDT, S., *et al.* The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. J Gen Virol, v.86, n.6, Jun, p.1581-8. 2005.
- VICTORIA, M., CARVALHO-COSTA, F. A., *et al.* Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. Pediatr Infect Dis J, v.26, n.7, Jul, p.602-6. 2007.
- VIZZI, E., FERRARO, D., *et al.* Detection of enteric adenoviruses 40 and 41 in stool specimens by monoclonal antibody-based enzyme immunoassays. Res Virol, v.147, n.6, Nov-Dec, p.333-9. 1996.
- WALTER, J. E., MITCHELL, D. K. Astrovirus infection in children. Curr Opin Infect Dis, v.16, n.3, Jun, p.247-53. 2003.
- WILHELM, I., ROMAN, E., *et al.* Viruses causing gastroenteritis. Clin Microbiol Infect, v.9, n.4, Apr, p.247-62. 2003.
- WILLCOCKS, M. M., BROWN, T. D., *et al.* The complete sequence of a human astrovirus. J Gen Virol, v.75, Jul, p.1785-8. 1994.
- WILLCOCKS, M. M., CARTER, M. J., *et al.* Growth and characterisation of human faecal astrovirus in a continuous cell line. Arch Virol, v.113, n.1-2, p.73-81. 1994
- WOLD, W., HORWITZ, M.S. Adenoviruses. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. *Fields Virology*, ed. 5 Lippincott-Williams & Wilkins, 2007.
- WOOD, D. J., LONGHURST, D., *et al.* One-year prospective cross-sectional study to assess the importance of group F adenovirus infections in children under 2 years admitted to hospital. J Med Virol, v.26, n.4, Dec, p.429-35. 1988.
- WRIGHT, S.A., BIELUCH, V. M. Select nosocomial viral infection. HeartLung, v.22, n.2, Mar-Apr, p.183-187. 1993.
- YAMAZAKI, K., OSETO, M., *et al.* Reverse transcription-polymerase chain reaction detection and sequence analysis of small round-structured viruses in Japan. Arch Virol Suppl, v.12, p.271-6. 1996.

APÊNDICES

APENDICE I

APENDICE II

APENDICE III

APENDICE IV

ANEXO