

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-graduação - Mestrado em Biologia Parasitária

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ASTROVÍRUS E
NOROVÍRUS EM CASOS DE GASTROENTERITE AGUDA EM CRIANÇAS
HOSPITALIZADAS NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO**

Matías Victoria Montero

Rio de Janeiro

2006



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Matías Victoria Montero

“Detecção e caracterização molecular de astrovírus e norovírus em casos de gastroenterite aguda em crianças hospitalizadas no município do Rio de Janeiro”

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Virologia

Orientadores: Dr. José Paulo Gagliardi Leite
Dra. Marize Pereira Miagostovich

RIO DE JANEIRO
Março/2006



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: Matías Victoria Montero

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ASTROVÍRUS E
NOROVÍRUS EM CASOS DE GASTROENTERITE AGUDA EM CRIANÇAS
HOSPITALIZADAS NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO**

ORIENTADORES: Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite
Prof. Dra. Marize Pereira Miagostovich

Aprovada em: 21/03/2006

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar - Presidente
Prof. Dra. Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia
Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Membros Suplentes

Prof. Dra. Jussara Pereira do Nascimento
Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

Rio de Janeiro, 21 de março de 2006

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Comparada do Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz sob orientação dos Drs. José Paulo Gagliardi Leite e Marize Pereira Miagostovich.

"Sei que meu trabalho é
uma gota no oceano, mas
sem ele, o oceano seria
menor."

Madre Teresa de Calcutá

DEDICATÓRIA

A meus **pais Miguel e Zully**, a minha **irmã Sabina**, pelo amor eterno em todo momento, apoio incondicional, amizade e conselhos sempre importantes.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, meu pai brasileiro, pela amizade, apoio, tanto no plano profissional como pessoal, e por ter me aceitado como seu aluno sem saber absolutamente nada sobre minha pessoa.

À Dra. Marize Pereira Miagostovich, minha mãe brasileira, pela amizade, e por estar sempre ao meu lado ajudando na realização deste trabalho. Sempre disponível em minhas atividades no laboratório.

Ao Alexandre Fialho, Alexandre Pina, Ana Maria Pinto, Carmen Baur, colegas da turma do mestrado, Débora Tavares, Edson Pereira, Fabiana Fioretti, Filipe Aníbal Costa, Flávia Guimarães, Francisca dos Santos, funcionários e alunos do Pavilhão Cardoso Fontes, Gilmar Alcantara, Gonzalo Bello, Irene Araújo, Joeler Vargas, Josélio Maria Galvão, Marcelle Silva, Marcos Bryan, Maria da Penha Xavier, Mariana Vidale, Marilda Almeida, Mônica Ferreira, Niele Costa, Regianne Guedes, Rosane Maria Assis, Tatiana Robaina e Tulio Fumian pela amizade, apoio neste empreendimento, bons momentos de convivência no laboratório e fora dele, ajuda na bancada com os reagentes, equipamentos, suporte informático, coleta das amostras nos hospitais, nas análises estatísticas e no seqüenciamento.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FIOCRUZ e ao “American Fellows Program (Partners of the Americas)” pelo suporte financeiro deste trabalho.

Aos Drs. Ana Maria Gaspar, Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia, Amauri Alcindo Alfieri, Jussara Pereira do Nascimento e Marcelo Alves Pinto por aceitarem participar da banca examinadora desta dissertação.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL – microlitro
 μM – micromolar
A – adenina
Å – angstrom
 A_{260} – absorvância a 260 nm
aa – aminoácido
AdV – adenovírus
AIDS – síndrome de imunodeficiência adquirida
BGA – antígeno do grupo sanguíneo
C – citosina
CA – Califórnia
 CaCl_2 – cloreto de cálcio
 CaCo-2 – células de adenocarcinoma de colon humano
CDC – “Centers for Disease Control and Prevention”
CME – criomicroscopia eletrônica
CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
 CsCl – cloreto de cério
dATP – desoxiadenina
dCTP – desoxicitosina
dGTP – desoxiguanina
DNA – ácido desoxirribonucléico
dTTP – desoxitimina
dXTP – desoxiribonucleotídeos
EDTA – ácido etilenodiamino tetracético
EGPA – eletroforese em gel de poliacrilamida
EIARA – ensaio imunoenzimático para detecção de antígenos de rotavírus e adenovírus
EIE – ensaio imunoenzimático
EUA – Estados Unidos da América
F – feminino
FAstV – astrovírus felino
FUT2 – $\alpha 1,2$ fucosiltransferase
FUT3 - glicosiltransferase Lewis

G – genogrupo
g – grama
G – guanina
GG – grupo genético
HAstV – astrovírus humanos
HCl – ácido clorídrico
HCV – calicivírus humanos
HEK – “human embryonic cells” – células de rim de embrião humano
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HMJ – Hospital Municipal Jesus
HMSA – Hospital Municipal Souza Aguiar
HMSN – Hospital Municipal Salles Neto
ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IF – imunofluorescência
IFN- γ – interferon gama
Ig – imunoglobulina
IL – interleucina
IME – imunomicroscopia eletrônica
INMET – Instituto Nacional de Meteorologia
kb – kilo bases
kDa – quilodalton
LLCMK2 - células de rim de macaco rhesus
M – masculino
m – meses
ME – microscopia eletrônica
mg – miligrama
MgCl₂ – cloreto de magnésio
mL – mililitro
mM – milimolar
mm³ – milímetros cúbicos
NaOH – hidróxido de sódio
NASBA – técnica de amplificação baseada na seqüência de ácido nucléico
ng – nanograma
nm – nanômetro

nsP – “non structural protein” – proteína não estrutural
NTPase - proteína nucleosídeo trifosfatase
NV – norovírus
°C – graus centígrados
ORF – “open reading frame” - fase aberta de leitura
p – probabilidade
PA – pró-análise
PAstV – astrovírus suíno
pH – concentração de íons hidrogênio livre
q.s.p. – quantidade suficiente para
RJ – Rio de Janeiro
RNA – ácido ribonucléico
RNAm – ácido ribonucléico mensageiro
RpRd – RNA polimerase RNA dependente
RT-PCR - reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa
RV – rotavírus
SI – sem informação
SV – Sapovírus
T – timina
Th – célula T “helper”
Tris – hidroximetil-tris-aminometano
U – unidades
UTR – “untranslated region” - região não traduzida
UV – ultravioleta
VLP – “virus like-particles” - partículas tipo-vírus
VPA – vírus pequenos e arredondados
VPg – “virus protein genome” - proteína viral associada ao genoma

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Árvore filogenética de máxima semelhança dos gêneros *Mamastrovirus* e *Avastrovirus* baseada na análise da região do genoma que codifica para a proteína do capsídeo. 3
- Figura 1.2** Dendograma demonstrando a correlação entre genótipo e sorotipo dos astrovírus humanos (HAstV) baseado na análise da região do genoma que codifica para a proteína do capsídeo. 4
- Figura 1.3** Morfologia de astrovírus humano. 5
- Figura 1.4** Análise filogenética comparando a sequência nucleotídica completa do capsídeo das famílias *Picornaviridae* e *Caliciviridae*. 6
- Figura 1.5** Árvore filogenética baseada na sequência completa de aminoácidos do capsídeo dos norovírus (NV). 7
- Figura 1.6** Morfologia dos norovírus. 9
- Figura 1.7** Organização do genoma dos HAstV tipo 2 (HAstV-2). 11
- Figura 1.8** Organização do genoma do Norovírus. 13
- Figura 1.9** Modelo dos produtos codificados pela fase de leitura aberta 1 e 2 (ORF1 e ORF2) de astrovírus humano. 14
- Figura 1.10** Modelo temporal do processamento proteolítico da poliproteína da fase aberta de leitura 2 (ORF2) dos astrovírus humanos pela protease viral. 15
- Figura 1.11** Modelo temporal do processamento proteolítico da poliproteína da fase aberta de leitura 1 (ORF1) pela protease viral. 16
- Figura 1.12** Vias de transmissão dos norovírus. 25
- Figura 4.1** Fluxograma ilustrando os procedimentos para detecção e caracterização molecular de Astrovírus humanos (HAstV) e Norovírus (NV) a partir das amostras fecais de crianças hospitalizadas no município do Rio de Janeiro. 35
- Figura 5.1** Eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa para a detecção de astrovírus humano. 46
- Figura 5.2** Eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa para a detecção de norovírus. 47
- Figura 5.3** Distribuição por grupo etário de casos de infecção por astrovírus humanos

(HAsV) e norovirus (NV) em crianças com gastroenterite aguda hospitalizadas no município do Rio de Janeiro.	50
Figura 5.4 Percentual acumulado do grupo etário das infecções causadas por astrovirus humano (HAsV) e norovirus (NV).	50
Figura 5.5 Distribuição mensal de casos de gastroenterite aguda por astrovirus humanos (HAsV) e norovirus (NV) em crianças hospitalizadas no município do Rio de Janeiro, 2004.	51
Figura 5.6 Distribuição mensal de casos de gastroenterite infantil aguda por astrovirus humanos (HAsV) e valores médios de temperatura e precipitação no município do Rio de Janeiro, 2004.	52
Figura 5.7 Distribuição mensal de casos de gastroenterite infantil aguda por norovirus (NV) e valores médios de temperatura e precipitação no município do Rio de Janeiro, 2004.	53
Figura 5.8 Árvore filogenética obtida a partir da análise de 348 nucleotídeos (nt 4574 – 4921) da região (ORF2) que codifica para a proteína do capsídeo do astrovirus humano (HAsV) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.	55
Figura 5.9 Árvore filogenética obtida a partir da análise de 172 nucleotídeos (nt 5114 – 5285) da região do genoma que codifica para a polimerase do norovirus (NV) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.	58
Figura 5.10 Árvore filogenética de amostras de astrovirus humano tipo 1 (HAsV-1) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.	62
Figura 5.11 Árvore filogenética das amostras pertencentes ao astrovirus humano tipo 2 (HAsV-2) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.	64
Figura 5.12 Árvore filogenética das amostras pertencentes ao astrovirus humano tipo 4 (HAsV-4) da amostra obtida no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.	66
Figura 5.13 Árvore filogenética das amostras pertencentes ao astrovirus humano tipo 8 (HAsV-8) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 Classificação em genogrupos (G) e grupos genéticos (GG) de norovírus (NV).	8
Quadro 4.1 Iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase para amplificação do genoma de astrovírus humano e norovírus.	33
Quadro 4.2 Reagentes utilizados na reação da Transcrição Reversa (RT) para a obtenção de cDNA de astrovírus humanos e norovírus a partir do RNA viral extraído.	37
Quadro 4.3 Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para amplificação de astrovírus humanos.	38
Quadro 4.4 Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para amplificação de norovírus.	39
Quadro 4.5 Reagentes utilizados na reação de sequenciamento para caracterização molecular de astrovírus humanos e norovírus.	40
Quadro 4.6 Protótipos de astrovírus humanos (HAstV), astrovírus de peru (TAstV) e norovírus (NV) resgatados do “Entrez Pubmed - GenBank” utilizados neste estudo.	42
Quadro 4.7 Origem, genótipo, ano de obtenção e número de acesso das sequências de astrovírus humano (HAstV) resgatadas do “Entrez Pubmed - GenBank”.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 Detecção de astrovírus humano (HAstV) e norovírus (NV) pela reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa em 318 casos de gastroenterite aguda em crianças hospitalizadas de acordo com a origem das amostras.	45
Tabela 5.2 Casos de infecções mistas por astrovírus humanos (HAstV), norovírus (NV) e rotavírus (RV) em 318 casos de gastroenterite aguda provenientes de crianças hospitalizadas no município do Rio de Janeiro.	46
Tabela 5.3 Distribuição por grupo etário e sexo de casos de infecções por astrovírus humano (HAstV) e norovírus (NV) em crianças com gastroenterite aguda hospitalizadas no município do Rio de Janeiro.	48
Tabela 5.4 Distribuição por grupo etário e sexo de casos de infecção mista de astrovírus humanos (HAstV), norovírus (NV) e rotavírus (RV).	49
Tabela 5.5 Manifestações clínicas observadas em crianças com infecção por astrovírus humano (HAstV), norovírus (NV), rotavírus (RV) e co-infecções hospitalizadas no município do Rio de Janeiro, 2004.	54
Tabela 5.6 Amostras de astrovírus humano (HAstV) utilizadas na análise filogenética de acordo com genótipo, hospital de origem, mês, e número de acesso do “GenBank”.	56
Tabela 5.7 Amostras de norovírus (NV) utilizadas na análise filogenética de acordo com o genogrupo, hospital de origem, mês e número de acesso do “GenBank”.	60
Tabela 5.8 Genotipagem dos casos de co-infecção em crianças com gastroenterite aguda hospitalizadas no município do Rio de Janeiro, 2004.	61
Tabela 5.9 Matriz de identidade de 348 nucleotídeos (nt 4574 - 4921) da região do capsídeo de astrovírus humanos tipo 1 (HAstV-1) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.	63
Tabela 5.10 Matriz de identidade de 348 nucleotídeos (nt 4574 - 4921) da região do capsídeo de astrovírus humano tipo 2 (HAstV-2) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.	65
Tabela 5.11 Matriz de identidade de 348 nucleotídeos (nt 4574 - 4921) da região do capsídeo de astrovírus humano tipo 4 (HAstV-4) da amostra obtida no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.	67
Tabela 5.12 Matriz de identidade de 348 nucleotídeos (nt 4574 - 4921) da região do	

capsídeo de astrovírus humano tipo 8 (HAstV-8) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.

68

ÍNDICE

RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Gastreenterite	1
1.2 Histórico	1
1.3 Classificação e Morfologia	3
1.4 Características Físico-químicas	9
1.5 Genoma e Proteínas	10
1.6 Replicação Viral	13
1.7 Patogênese e Características Clínicas	17
1.8 Resposta Imunológica do Hospedeiro	18
1.9 Diagnóstico Laboratorial	20
1.10 Epidemiologia e Distribuição Geográfica	22
1.11 Prevenção e Controle	26
2 RELEVÂNCIA	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Geral	29
3.2 Específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAL	30
4.1.1 Definição de Caso de Gastreenterite	30
4.1.2 Amostras Clínicas	30
4.1.3 Amostras Controles	30
4.1.4 Comitê de Ética	31
4.1.5 Soluções	31
4.1.5.1 Tampão Tris/HCl/Ca ⁺⁺ 0,01M pH 7,2	31
4.1.5.2 Sílica	31
4.1.5.3 EDTA 0,2M pH 8,0	32
4.1.5.4 Tris-HCl 0,1M pH 6,4	32
4.1.5.5 Tampão L6	32
4.1.5.6 Tampão L2	33
4.1.5.7 Iniciadores	33

4.1.5.8 Gel de agarose a 1,5%	34
4.1.5.9 Solução de brometo de etídio	34
4.2 MÉTODOS	34
4.2.1 Suspensão fecal a 10%	36
4.2.2 Extração do RNA viral pelo método da sílica (Boom et al, 1990)	36
4.2.3 Extração do RNA viral pelo kit comercial “QIAamp® Viral RNA Mini Kit”, QIAGEN™	36
4.2.4 Reação de transcrição reversa para a obtenção de cDNA	37
4.2.5 Detecção molecular de astrovírus humanos e norovírus pela reação em cadeia pela polimerase	38
4.2.6 Análise dos amplicons por eletroforese em gel de agarose	39
4.2.7 Sequenciamento parcial do genoma viral	40
4.2.8 Análise filogenética das seqüências	41
4.2.9 Análises estatísticas	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Detecção de astrovírus humanos e norovírus pela reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa	45
5.2 Distribuição mensal das infecções por astrovírus humanos e norovírus	51
5.3 Manifestações clínicas associadas às infecções por astrovírus humanos e Norovírus	53
5.4 Caracterização molecular de astrovírus humanos e norovírus	54
5.5 Epidemiologia Molecular	61
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÕES	77
8 PERSPECTIVAS	79
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXOS	
Anexo 1- Ficha de Informações Clínicas e Epidemiológicas	97

RESUMO

A gastroenterite viral aguda é responsável por uma significativa morbidade e mortalidade em crianças e é crescente a importância dos astrovírus humanos (HAstV) e dos norovírus (NV) como agentes desta infecção em todo o mundo. O objetivo deste estudo foi determinar a frequência e a caracterização molecular de HAstV e NV pela reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) e sequenciamento parcial de 318 amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda hospitalizadas no município do Rio de Janeiro. As amostras foram obtidas durante o ano de 2004 em três hospitais da rede municipal (Jesus, Salles Neto e Souza Aguiar), tendo sido previamente investigadas para detecção de Rotavírus (RV) e Adenovírus entéricos (AdV). Os diferentes protocolos de RT-PCR detectaram um percentual de positividade de 20,4% (65) e 13,5% (43) para NV e HAstV, respectivamente. Um total de 30 (9,4%) co-infecções foram identificadas, sendo 16 HAstV e RV, oito NV e RV, três HAstV e NV e três triplas infecções (HAstV, NV, RV). As infecções por HAstV e NV foram detectadas em todos os grupos etários estudados, com cerca de 80% das infecções ocorridas em crianças de até 24 meses. As infecções por HAstV apresentaram um pico de positividade durante o período de março a maio, quando observou-se queda na temperatura média e na precipitação. Foram observados dois períodos de maior ocorrência de casos de NV, março-maio e setembro-outubro, sendo evidenciada uma relação inversamente proporcional entre a frequência de detecção dos NV e a precipitação, associando os NV com períodos secos. Vômito, tosse e febre foram as manifestações clínicas mais frequentemente observadas. A genotipagem de 35 amostras de HAstV pelo sequenciamento parcial da região do genoma que codifica para a proteína do capsídeo (ORF2) caracterizou 25 (71,4%) HAstV tipo 1, 6 (17,1%) HAstV tipo 2, 3 (8,6%) HAstV tipo 8 e 1 (2,9%) HAstV tipo 4. O sequenciamento parcial de 28 amostras da região que codifica a polimerase dos Norovírus identificou uma amostra como pertencente ao genogrupo (G) I, Grupo Genético (GG) 2, e as restantes como GII. A região analisada não permitiu a caracterização dos grupos genéticos das amostras pertencentes ao GII. Os dados obtidos neste trabalho demonstram a importância dos NV e dos HAstV como importantes agentes da gastroenterite infantil aguda. A implantação do diagnóstico destes vírus poderia auxiliar nos cuidados aos pacientes pela redução no uso desnecessário de antibióticos, principalmente quando o diagnóstico de rotavírus é descartado.

ABSTRACT

Acute viral gastroenteritis is responsible for significant morbidity and mortality among children and human astrovirus (HAstV) and norovirus (NV) have been identified increasingly worldwide as agents of those infections. The goals of this study were to determine the prevalence and molecular characterization of HAstV and NV by reverse-transcription polymerase chain reaction and partial sequencing in 318 fecal samples from children with acute gastroenteritis hospitalized in the municipality of Rio de Janeiro. The samples were obtained in 2004 from three hospitals (Hospital Jesus, Salles Neto and Souza Aguiar) and were previously investigated for the presence of Rotavirus (RV) and enteric Adenovirus (AdV). The viral RNA of NV and HAstV were detected in 20.4% (65) and 13.5% (43) of the samples, respectively. A total of 30 (9.4%) co-infections were identified, where 16 were by HAstV – RV, 8 by NV – RV, 3 by HAstV – NV and 3 mixed infections by HAstV – NV – RV. The infections by HAstV and NV were detected in all age groups, with nearly 80% of the cases occurring in children until 2 years-old, with a higher percentage observed in children under 12 months-old. HAstV infections were more prevalent from March to May of that year, when temperature and rainfall are lower. On the other hand, NV cases were not only detected from March to May but also during September-October, suggesting an association of NV infections with dry season. Vomiting, cough and fever were the main clinical manifestations observed on those cases. The partial sequencing of the open reading frame 2 (ORF2) of 35 HAstV strains characterized 25 (71.4%) as genotype 1 (HAstV-1), 6 (17.1%) HAstV-2, 3 (8.6%) HAstV-8 and 1 (2.9%) HAstV-4. One out of 28 NV was characterized as belonging to Genogroup (G) I, Genetic Cluster 2 by the partial sequencing of the polymerase region gene whereas the others as GII. However, we were unable to cluster the latter G by using this region. The data obtained from this study have demonstrated the importance of NV and HAstV as agents causing acute infantile gastroenteritis and that the diagnostic implementation of those viruses could contribute with patients care, reducing the unnecessary use of antibiotics, mainly when the RV diagnostic is negative.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gastroenterite

O termo gastroenterite inclui uma variedade de estados patológicos do trato gastrointestinal, cuja principal manifestação é a diarreia, que pode vir acompanhada por náusea, vômito e dor abdominal. A gastroenterite aguda é causada por agentes infecciosos que aderem ou invadem a mucosa intestinal, assim como pela produção de enterotoxinas por esses agentes (Wilhelmi et al, 2003; Diskin, 2004).

A gastroenterite aguda é uma das enfermidades humanas mais comuns em crianças. Calcula-se que anualmente mais de 700 milhões de crianças menores de cinco anos apresentam quadro de gastroenterite aguda, sendo a mortalidade estimada em 1,8 milhões de casos por ano (WHR, 2005).

Os vírus são importantes agentes etiológicos desta doença, principalmente em crianças. Do ponto de vista clínico, as gastroenterites agudas causadas por vírus dificilmente podem ser distinguidas daquelas causadas por bactérias, sendo geralmente um processo auto-limitado de diarreia e vômito, com duração aproximada de 1 a 7 dias (Wilhelmi et al, 2003).

O diagnóstico da etiologia viral das gastroenterites foi estabelecido na década de 1970 pelo uso da microscopia eletrônica (ME) e, posteriormente, métodos de biologia molecular demonstraram a real importância dos vírus na gastroenterite aguda (Kapikian et al, 1972; Jiang et al, 1992).

Os rotavírus (RV) têm sido descritos como os principais responsáveis pela diarreia grave em crianças menores de cinco anos, seguido pelos calicivírus humanos (HCV) – norovírus (NV) e sapovírus (SV) –, astrovírus humanos (HAstV) e adenovírus entéricos (AdV). Recentemente, diversos estudos apontam os NV e os HAstV como importantes agentes etiológicos deste agravo (Wilhelmi et al, 2003).

1.2 Histórico

Os NV e HAstV foram inicialmente detectados por ME (Kapikian et al, 1972; Appleton & Higgins, 1975). Em um surto de gastroenterite em crianças de uma escola

primária em Norwalk, Ohio, Estados Unidos de América (EUA), investigado pelo “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), 50% dos estudantes e professores desenvolveu uma doença gastrointestinal com duração de 24 horas, durante o período de dois dias. As principais manifestações clínicas foram vômitos e náuseas, sendo que alguns dos pacientes desenvolveram diarreia. Infecções secundárias resultantes dos contatos com os casos primários, também foram observadas. Filtrados de “swab” retal dos casos secundários foram administrados oralmente a voluntários, que desenvolveram a doença. Devido ao não isolamento do agente etiológico em cultivos celulares foram realizados estudos de imunomicroscopia eletrônica (IME) com filtrados de fezes de voluntários e soros de voluntários convalescentes, sendo observado agregados de partículas semelhantes a vírus (“like-virus”), não envelopadas de 27 nanômetros (nm) de diâmetro (Kapikian et al, 1972; Kapikian 2000).

Na década de 1980 ensaios imunoenzimáticos (EIE) foram desenvolvidos para a detecção de antígenos de NV em amostras fecais, sendo de grande utilidade no esclarecimento de surtos de gastroenterite (Herrmann et al, 1985). Na década de 1990, o avanço no desenvolvimento das técnicas de biologia molecular permitiu caracterizar o genoma do vírus e desenvolver uma reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) para sua detecção a partir das amostras fecais de humanos (Jiang et al, 1992; Jiang et al, 1993a).

Appleton e Higgins (1975) identificaram os primeiros astrovírus humanos (HAstV) em um surto de gastroenterite em crianças cujas manifestações clínicas eram diarreia e vômito. Utilizando a ME, identificaram vírus diferentes em tamanho e forma dos NV e dos RV, aos quais denominaram de vírus pequenos e arredondados (VPA). Como a morfologia do vírus ao microscópio eletrônico apresentava o aspecto de uma estrela com cinco ou seis pontas foram denominados de astrovírus (Madeley & Crosgrave, 1975). Vírus similares foram descritos em outras espécies de mamíferos (Bass & Qiu, 2000).

Lee e Kurtz (1981) foram os primeiros a documentar que os astrovírus podiam ser propagados em cultivos celulares de rim de embrião humano (HEK) e de rim de macaco rhesus (LLCMK2), sendo a tripsina fundamental para a replicação viral.

Jiang e colaboradores (1993) determinaram a seqüência e organização genômica do HAstV permitindo o desenvolvimento de metodologias moleculares, entre as quais a RT-PCR para a detecção destes vírus em amostras fecais (Shi et al, 1994).

1.3 Classificação e Morfologia

1.3.1 Astrovírus

Os astrovírus pertencem à família *Astroviridae*, a qual está dividida em dois gêneros: *Mamastrovirus* e *Avastrovirus*. No primeiro gênero se encontram os HAstV e os astrovírus que infectam felinos (FAstV), suínos (PAstV), caninos, ovinos, bovinos e cervídeos. O gênero *Avastrovirus* inclui astrovírus que infectam patos, perus e galinhas (Figura 1.1) (Walter & Mitchell, 2003).

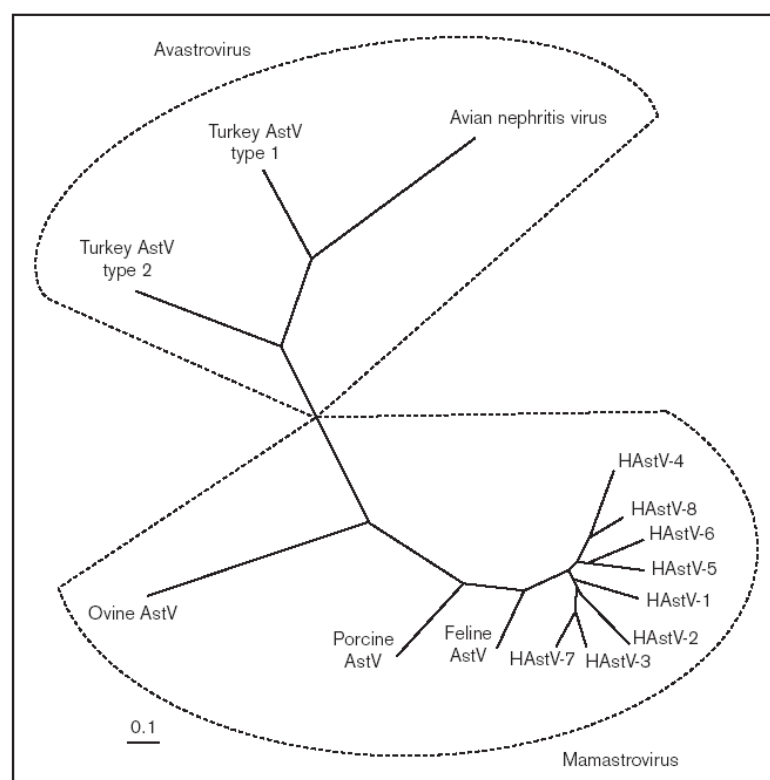


Figura 1.1 Árvore filogenética de máxima semelhança dos gêneros *Mamastrovirus* e *Avastrovirus* baseada na análise da região do genoma que codifica para a proteína do capsídeo. Walter & Mitchell, 2003.

Os sorotipos dos HAstV têm sido identificados pela IME, EIE e imunofluorescência (IF) e classificados em oito sorotipos segundo a reatividade das proteínas do capsídeo com anticorpos policlonais e monoclonais (Mustafa et al, 2000; Tai et al, 2003).

Os HAstV também podem ser classificados em genótipos baseados no seqüenciamento da região do gene (348pb) que codifica para a proteína do capsídeo (ORF2), que é conservada entre amostras do mesmo sorotipo, porém variável entre distintos sorotipos (Noel et al, 1995). Inicialmente foram estabelecidos sete sorotipos correlacionados com sete genótipos, entretanto, a existência de um oitavo genótipo foi recentemente demonstrada (Mustafa et al, 2000; Taylor et al, 2001). A correlação entre genótipo e sorotipo permite a utilização da RT-PCR para determinar indiretamente os sorotipos a partir dos genótipos (Figura 1.2) (Schnagl et al, 2002).

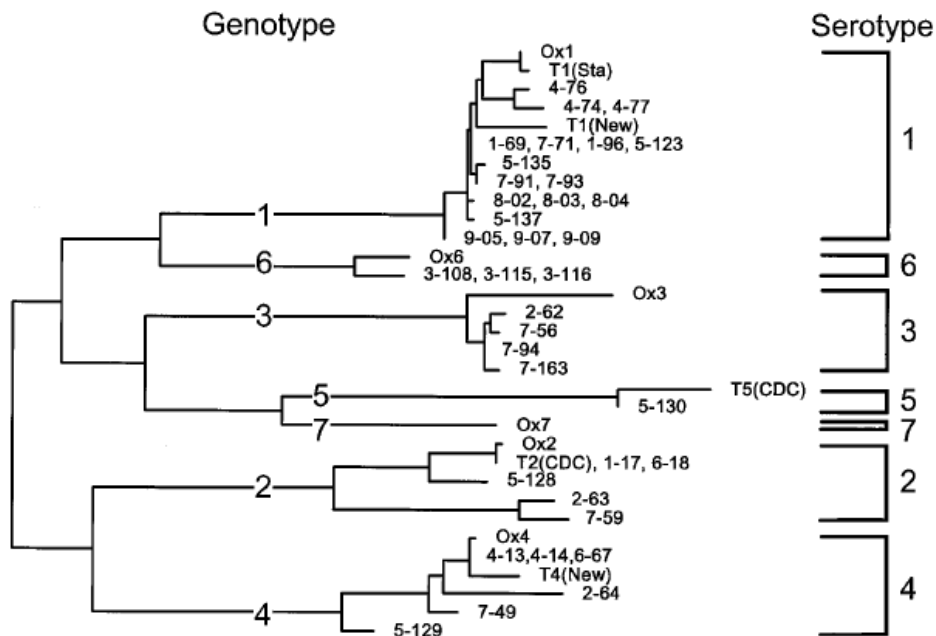


Figura 1.2 Dendrograma demonstrando a correlação entre genótipo e sorotipo dos astrovírus humanos (HAstV) baseado na análise da região do genoma que codifica para a proteína do capsídeo. Noel et al, 1995.

As partículas dos HAstV quando observadas na ME exibem uma borda contínua e arredondada (Figura 1.3), uma região central clara e uma camada de espículas superficiais dando o aspecto estelar com 6 vértices (Madeley, 1979; Risco et al, 1995). Apesar das partículas de HAstV serem identificadas por ME pela morfologia estelar, apenas 10% destas partículas apresentam esta estrutura típica quando observadas em fezes de pacientes com gastroenterite aguda (Maass et al, 1978).

O vírion de 28 nm de diâmetro é composto por um capsídeo icosaédrico sem envelope e um genoma de RNA de fita simples poliadenilado, cujo tamanho varia de 6,8 a 7,6 kilo bases (kb) dependendo do sorotipo (Liu et al, 2004). A observação pela criomicroscopia eletrônica (CME) de partículas virais de HAstV purificadas de culturas celulares demonstrou um capsídeo sólido e ondulado (33 nm de diâmetro) com 30 espículas diméricas (5 nm de comprimento) (Figura 1.3) (Matsui & Greenberg, 2001).

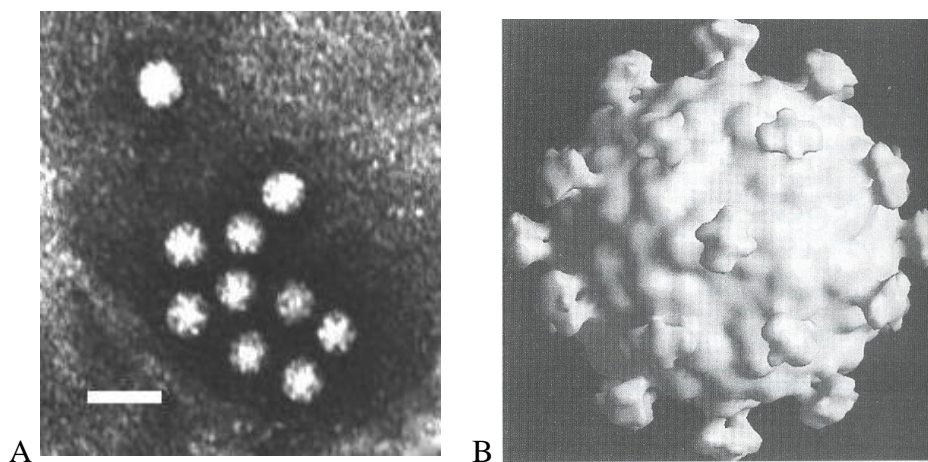


Figura 1.3 Morfologia de astrovírus humano. A) Imunomicroscopia eletrônica. Barra: 50nm. B) Criomicroscopia eletrônica (Adaptado de Matsui e Greenberg, 2001).

1.3.2 Norovírus

Inicialmente os “Norwalk like-virus” foram classificados na família *Picornaviridae* com base na aparência do vírion na ME. Posteriormente, a presença de uma proteína

estrutural principal no vírion purificado de material humano foi descrita como uma característica de associação com a família *Caliciviridae*. Esta classificação foi apoiada pela semelhança da seqüência do Norwalk vírus com outros vírus desta família, criada no Terceiro Encontro do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) em 1979 e cujas características são: a presença de uma proteína estrutural principal a partir da qual o capsídeo é construído e a existência de 32 depressões em forma de taça na superfície do vírion com simetria icosaédrica. O nome *Caliciviridae* deriva da palavra latina "*calix*", que significa taça, embora, usualmente, estes vírus não apresentem a morfologia típica de taça quando observados ao microscópio eletrônico. Outra característica principal desta família é a ausência do “cap” metilado no extremo 5' do RNA viral (Green et al, 2000; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/ICD-1011.htm> em 10 de janeiro de 2006).

A família *Caliciviridae* é constituída por quatro gêneros: *Vesivirus*, que tem como representante o vírus de exantema vesicular suíno; *Lagovirus*, cujo representante é o vírus da doença hemorrágica do coelho; *Norovirus*, cujos integrantes eram anteriormente denominados Norwalk vírus, Norwalk-like vírus ou “small round-structured viruses”; e *Sapovirus*, representado pelo vírus Sapporo (Figura 1.4) (Mayo, 2002).

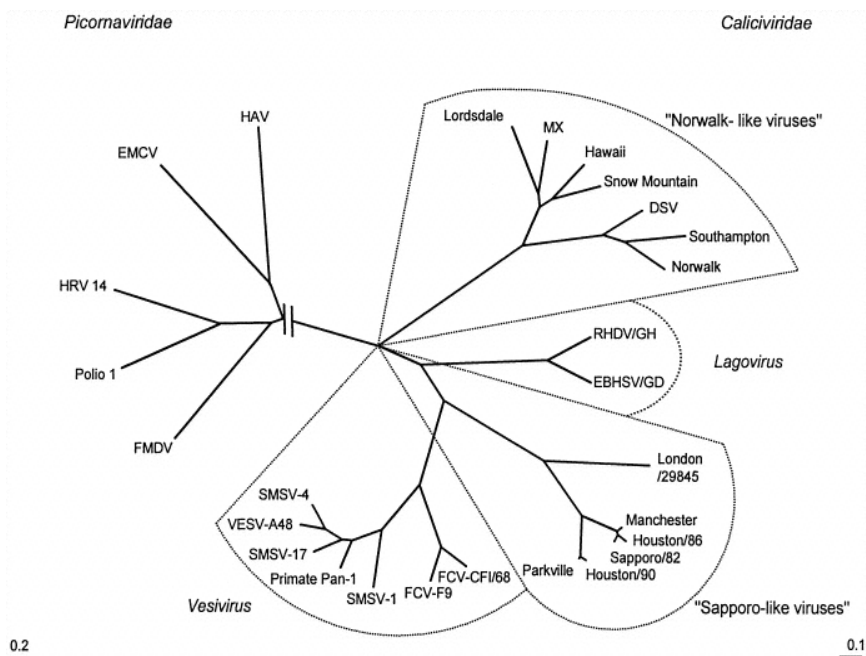


Figura 1.4 Análise filogenética comparando a seqüência nucleotídica completa do capsídeo das famílias *Picornaviridae* e *Caliciviridae*. Green et al (2000).

O gênero *Norovirus* está dividido em cinco genogrupos (GI, GII, GIII, GIV e GV) baseado na análise da sequência de aminoácidos (aa) da região que codifica o capsídeo (Figura 1.5). Os GI, II e IV são constituídos de NV de origem humana, com a exceção do GII/11 que é de origem suína. Os genogrupos são constituídos de grupos genéticos (GG) que representam a unidade mínima de classificação dos NV. Estes GG consistem em amostras agrupadas por similaridade de nucleotídeos (nt) e aa em um determinado ramo de uma árvore filogenética (Figura 1.5) (Ando et al, 2000). Duas amostras são consideradas como pertencentes a diferentes G se a distância entre elas pelo método de distância sem correção for $\geq 45\%$. Dentro do mesmo G, amostras que apresentam distância $\geq 14,3\% \leq 43,8\%$ são agrupadas em diferentes GG (Zheng et al, 2005). O quadro 1.1 descreve os diferentes G com seus respectivos GG.

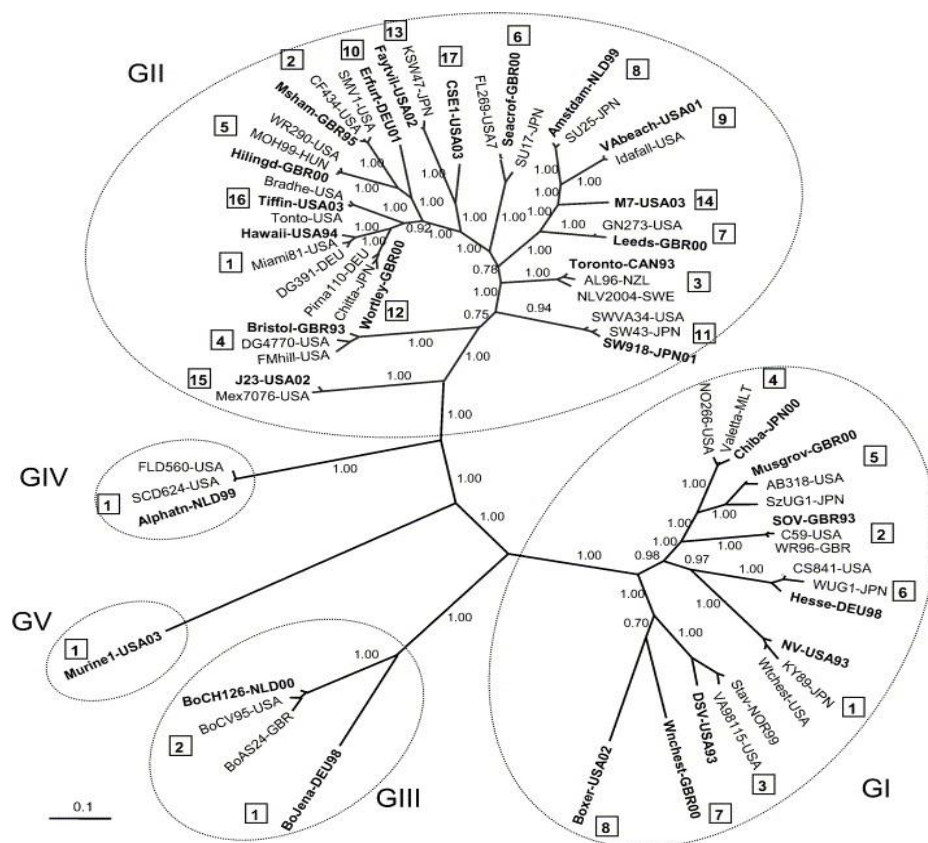


Figura 1.5 Árvore filogenética baseada na sequência completa de aminoácidos do capsídeo dos norovírus (NV). Os números nas caixas indicam o Grupo Genético. G: Genogrupo. Zheng et al, (2005).

Quadro 1.1 Classificação em genogrupos (G) e grupos genéticos (GG) dos norovírus (NV). Adaptado de Zheng et al, (2005)

Genogrupo	Hospedeiro	Número de Grupos Genéticos
GI	Humano	8
GII	Humano/Suíno	17
GIII	Bovino	2
GIV	Humano	1
GV	Murino	1

Os NV contêm um genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva de 7,7 kb, o qual é incorporado dentro do capsídeo que consiste em múltiplas cópias de uma única proteína (Prasad et al, 1994).

Quando observados pela CME a partícula viral dos NV é esférica com a superfície externa irregular (Figura 1.6). O vírion tem diâmetro de 40 nm, simetria icosaédrica com número de triangulação (T) igual a 3, apresentando 32 depressões grandes na superfície com uma profundidade de 5 nm e 9 nm de largura. Os 90 capsômeros estão formados por dímeros de uma única proteína capsídica (Prasad et al, 1994). O capsídeo tem uma camada protéica entre 10 e 15 nm de raio, com proeminências que se estendem no rádio externo de 19 nm, deixando depressões no icosaedro. A proteína capsídica tem dois domínios principais, chamados S e P unidos por uma “dobradiça” (Prasad et al, 1999).

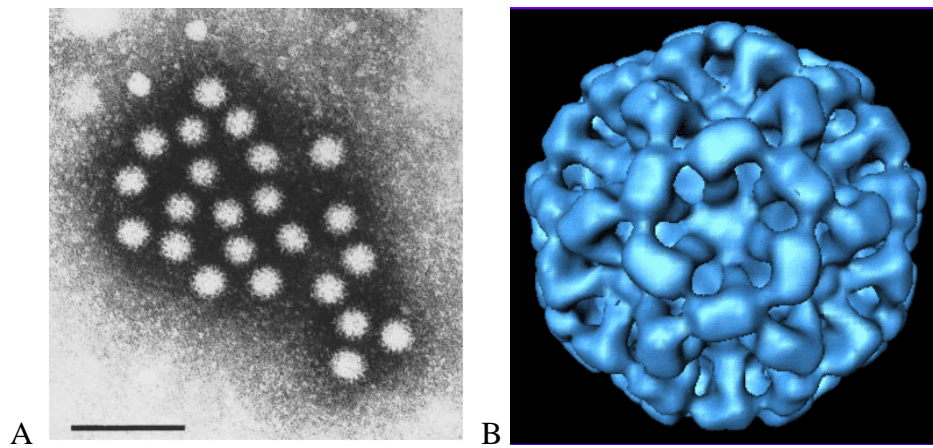


Figura 1.6 Morfologia dos norovírus. A) Partículas de Norwalk vírus em filtrado de fezes visualizado por imunomicroscopia eletrônica - Barra: 100nm (Adaptado de Kapikian, 2000). B) Criomicroscopia eletrônica (Prasad et al, 1999).

1.4 Características Físico-químicas

1.4.1 Astrovírus

As partículas virais dos HAstV são estáveis a pH 3, resistentes ao clorofórmio e a uma grande variedade de detergentes e solventes lipídicos. HAstV retêm a atividade infectante após 5 minutos a 60 °C, sendo inativados com 10 minutos de exposição. Também são estáveis quando estocados a -80 °C por um período de 10 anos, porém são instáveis se submetidos a repetidos descongelamentos. A partícula de HAstV tem uma densidade em gradiente de cloreto de cério (CsCl) de 1,35 a 1,37 g/mL (Matsui & Greenberg, 2001).

1.4.2 Norovírus

O vírus mantém a infectividade após o tratamento com éter 20% a 4 °C durante 18 horas ou quando incubados a 60 °C por 30 minutos (Green et al, 2001). A inativação dos calicivírus é diretamente proporcional ao aumento da temperatura, apresentando alta taxa de inativação a temperaturas superiores a 56 °C. A inativação utilizando radiação ultravioleta (UV) é dose dependente. São inativados a $\text{pH} \leq 5$ ou ≥ 10 e após 30 minutos em etanol 70%.

Perdem a infectividade após tratamento com cloro (≥ 3000 partes por milhão) à temperatura ambiente durante 30 minutos. Quando em suspensão fecal apresentam infectividade por até uma semana em temperaturas ≤ 20 °C (Duizer et al, 2004). Os NV têm uma densidade flutuante de 1,33 a 1,41 g/mL em CsCl.

1.5 Genoma e Proteínas

1.5.1 Astrovírus

O genoma dos HAsV é constituído por um RNA de fita simples de polaridade positiva com número de nt variando de 6844 a 7355, além de um RNA subgenômico de 2,8 kb (Walter & Mitchell, 2003). Contém três ORFs, chamadas ORF1a, ORF1b e ORF2. A ORF1a e a ORF1b, se encontram na região 5' do genoma e codificam as proteínas não estruturais (nsP); a ORF2, localizada na região 3', codifica a proteína do capsídeo de 70 kilo Dalton (kDa) (Jonassen et al, 2003) (Figura 1.7).

As ORF1a e ORF1b são traduzidas diretamente do RNA genômico viral e o produto da tradução da ORF1a é chamado proteína não-estrutural 1a (nsP1a) com massa molecular de 103 kDa, enquanto que o produto da ORF1b é uma proteína de fusão nsP1a/1b de 160 kDa. Estas poliproteínas são processadas proteoliticamente para gerar as proteínas virais implicadas na replicação do genoma viral (Geigenmüller et al, 2002).

A poliproteína codificada pela ORF1a apresenta 4 regiões hidrofóbicas transmembrana, motivos serina protease, uma proteína viral unida ao genoma (VPg), um sinal de localização nuclear e uma região hipervariável no extremo C-terminal (Guix et al, 2005). A ORF1b codifica para uma RNA polimerase RNA dependente (RpRd). A poliproteína nsP1a (103 kDa) inclui seqüências codificadas só pela ORF1a enquanto que a poliproteína nsP1ab (160 kDa) inclui, além da seqüência da ORF1a, a ORF1b, que é produzida por um mecanismo chamado “frameshift” traducional. Por analogia com outros vírus RNA de fita simples de polaridade positiva, acredita-se que as poliproteínas não estruturais são clivadas em pequenos polipeptídeos pela protease viral (Mendez et al, 2003; Al-Mutairy et al, 2005).

Existe uma região de sobreposição entre a ORF1a e a ORF1b que é altamente conservada entre os distintos sorotipos e apresenta uma seqüência heptamérica de “shift” (A

AAA AAC), com potencial para a formação de um “stem-loop” com importância no processo de “frameshifting” (Matsui & Greenberg, 2001).

A ORF2 do RNA subgenômico codifica as proteínas do capsídeo e é colinear com a porção do terço 3’ do RNA genômico (Geigenmüller et al, 2002).

As proteínas estruturais codificadas pela ORF2 são sintetizadas como um precursor poliprotéico de 780 aa que, posteriormente, é clivado originando os três polipeptídeos do capsídeo viral. Estudos sobre o sorotipo 8 revelaram que o capsídeo é formado por uma proteína de 70 kDa (VP70) que é clivada na presença da tripsina em três proteínas de 34, 27 e 25 kDa (Mendez et al, 2003).

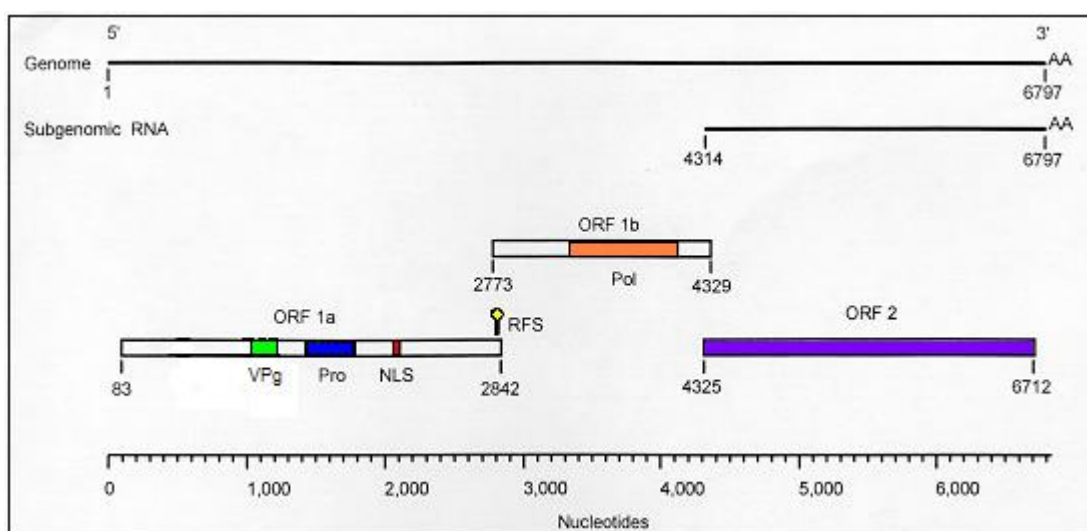


Figura 1.7 Organização do genoma do astrovírus humano tipo 2 (HAstV-2). VPg: Proteína de união ao genoma; Pro: Protease; NLS: Sinal de localização nuclear Pol: Polimerase; RFS: Estrutura do mecanismo de “frameshifting” ribossômico (Adaptado de Jiang et al, 1993).

1.5.2 Norovírus

O genoma dos NV é constituído por um RNA de fita simples de polaridade positiva com 7,7 kb que contém três ORFs, uma região não traduzida (UTR), tanto no extremo 3’ quanto no extremo 5’ e uma cauda poli(A) 3’. Contém também um RNA subgenômico de 2,3 kb com as ORF 2 e 3, e uma UTR do extremo 3’ (Bertolotti-Ciarlet et al, 2003). A ORF1 codifica uma poliproteína não estrutural de 200 kDa que apresenta motivos característicos de uma helicase, cisteína protease e RpRd. As ORF 2 e 3, localizadas no extremo 3' do genoma,

codificam as proteínas do capsídeo, sendo uma principal de 60 kDa (VP1) e outra menor (VP2) (Gutierrez-Escolano et al, 2003; Belliot et al, 2003; Bertolotti-Ciarlet et al, 2003).

A tradução da ORF1 produz três proteínas principais, que são derivadas do processamento proteolítico co-traducional da poliproteína pela protease viral (Blakeney et al, 2003). A poliproteína da ORF1 pode ser dividida desde o extremo amino ao carboxi-terminal em pelo menos 6 domínios funcionais que têm sido designados como proteína p48, nucleosídeo trifosfatase (NTPase), p20 ou p22 (dependendo do Genogrupo), VPg, protease e polimerase (Figura 1.8). A p48 poderia agir como proteína de estrutura para a formação de complexos de replicação viral. A proteína VPg, de 15 kDa, está unida ao RNA genômico e subgenômico e, provavelmente atua na síntese de novas moléculas de RNA viral. A protease viral pertence a uma família de proteases similares às serina proteases tipo-quimiotripsina celulares (Hardy, 2005).

A polimerase (aa 1281 até o extremo carboxi-terminal da ORF1) apresenta elementos estruturais (domínios) e catalíticos característicos das RpRd de outros vírus RNA de polaridade positiva. Existem diferenças significativas no segmento C-terminal desta proteína que consistem na localização deste domínio na fenda do sítio ativo perto do resíduo ácido aspártico catalítico (Hardy, 2005).

A proteína VP1 é constituída de 530 a 555 aa. Dois domínios conservados flanqueiam um domínio variável central que pode conter determinantes antigênicos que definem a especificidade da amostra. A VP1 se dobra em dois domínios principais designados domínio S e P. Os 225 aa do extremo N-terminal formam o domínio S e contém elementos essenciais para a formação do icosaedro. O domínio P compreende os demais aa do extremo C-terminal e está dividido em dois sub-domínios: P1 e P2. Os domínios P interagem em contatos diméricos aumentando a estabilidade do capsídeo e formando as protruções no vírion. O domínio P2 está composto de 127 aa inseridos no domínio P1. A região hipervariável no domínio P2 tem um papel importante na união ao receptor celular e na imunogenicidade (Hardy, 2005). A expressão da VP1 está regulada pela expressão da VP2 e pela presença da UTR na extremidade 3' (Bertolotti-Ciarlet et al, 2003).

A proteína VP2 é composta de 208 a 268 aa e exibe alta variabilidade na seqüência entre diferentes amostras. No vírion está presente em uma ou duas cópias, sendo essencial na síntese de partículas infecciosas (Hardy, 2005). A fosforilação desta proteína pode possuir um papel regulatório importante nos eventos de replicação viral. A região da proteína localizada entre os aa 108 e 152 contém o domínio de interação com a proteína VP1. A proteína VP2

atuaria na encapsidação do RNA genômico e na estabilização dos blocos capsídicos da VP1 para produzir partículas que sejam resistentes à degradação proteolítica (Glass et al, 2000, 2003; Bertolotti-Ciarlet et al, 2003).

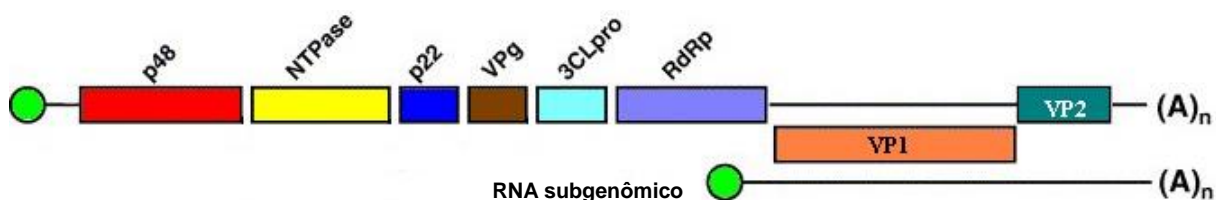


Figura 1.8 Organização do genoma do norovírus. p48: Proteína p48; NTPase: Proteína Nucleosídeo Trifosfatase; p22: Proteína p22; VPg: Proteína de União ao Genoma; 3CLpro: Protease; RdRp: Polimerase; VP1: Proteína Principal do Capsídeo; VP2: Proteína Menor do Capsídeo. Círculo Verde: VPg; (A)_n: Cauda Poli(A). Adaptado de Hardy (2005).

1.6 Replicação Viral

1.6.1 Astrovírus

Segundo estudo realizado por Donelli e colaboradores (1992), que utilizaram o HAstV-1 para infectar células HEK-293, o mecanismo pelo qual os astrovírus entram nas células susceptíveis é o de endocitose mediada por receptor.

A replicação do genoma viral ocorre em grandes complexos associados com membranas intracelulares, onde várias proteínas celulares interagem com proteínas virais. O complexo de replicação do RNA se ancora à membrana do retículo endoplasmático por meio de domínios transmembrana na região N-terminal da proteína nsP1a (Guix et al, 2004).

Após a infecção viral, duas proteínas não-estruturais são traduzidas a partir do RNA genômico (nsP1a e nsP1ab) e maturam por proteólise originando as proteínas virais implicadas na transcrição da molécula de RNA de polaridade negativa (RNA antígenômico). Esta molécula atua como molde para a transcrição do RNA genômico de 6,8 kb e das

moléculas de RNA de 2,4 kb subgenômico que contém a ORF2. A tradução do RNA subgenômico produz a proteína estrutural que será utilizada na formação dos capsídeos da progênie viral (Guix et al, 2005).

A proteína nsP1a é clivada co-traducionalmente, independente da protease viral, próximo do aa 170, produzindo um fragmento de 20 kDa cuja função é desconhecida. Clivagens nos aa 410 e aa 655 produzem uma proteína de 27 kDa que contém o motivo protease (aa 454 a aa 569). Supõe-se que este fragmento não se localize no núcleo já que o sinal de localização nuclear se encontra fora dele e que a protease não se ancore na membrana. Estas clivagens parecem ser dependentes da enzima serina protease da nsP1a (Geigenmüller et al, 2002).

Clivagens na nsP1ab originam os produtos protéicos de 145, 85 e 57 kDa. Os dois primeiros representam intermediários do processamento e o último a RNA polimerase viral madura (Figura 1.9) (Mendez et al, 2003).

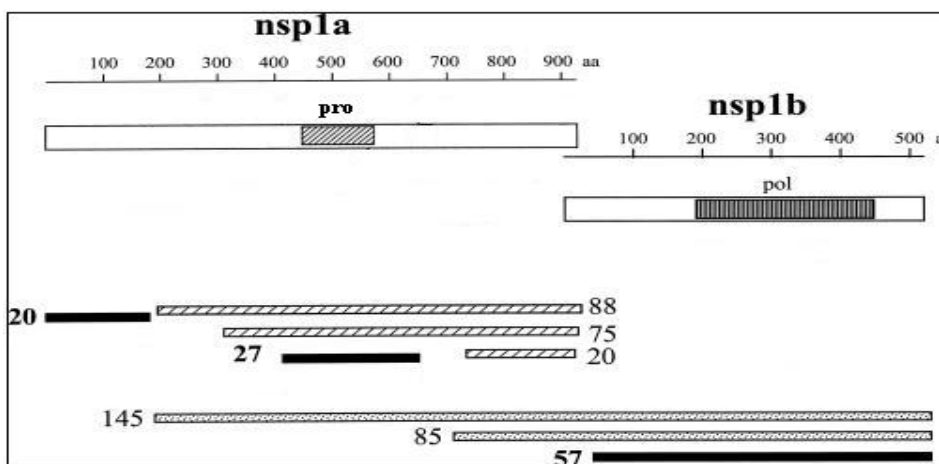


Figura 1.9 Modelo dos produtos codificados pela fase de leitura aberta 1 e 2 (ORF1 e ORF2) de astrovírus humano. As caixas grandes representam as proteínas nsP1a e nsP1b e as menores, dentro destas, representam a protease (pro) e a polimerase (pol). Os produtos intermediários do processamento da poliproteína nsP1a são representados como faixas listradas e os da nsP1ab como faixas pontilhadas. Os produtos finais estão representados como faixas pretas. Adaptado de Mendez et al (2003).

A proteína capsídica de 90 kDa (VP90) é clivada originando uma proteína de 70 kDa (VP70) que forma o vírion. Na presença de tripsina a VP70 origina as proteínas VP34 (34 kDa), VP27 (27 kDa) e VP25 (25 kDa) formando o capsídeo do vírion infeccioso (Figura 1.10) (Mendez et al, 2002).

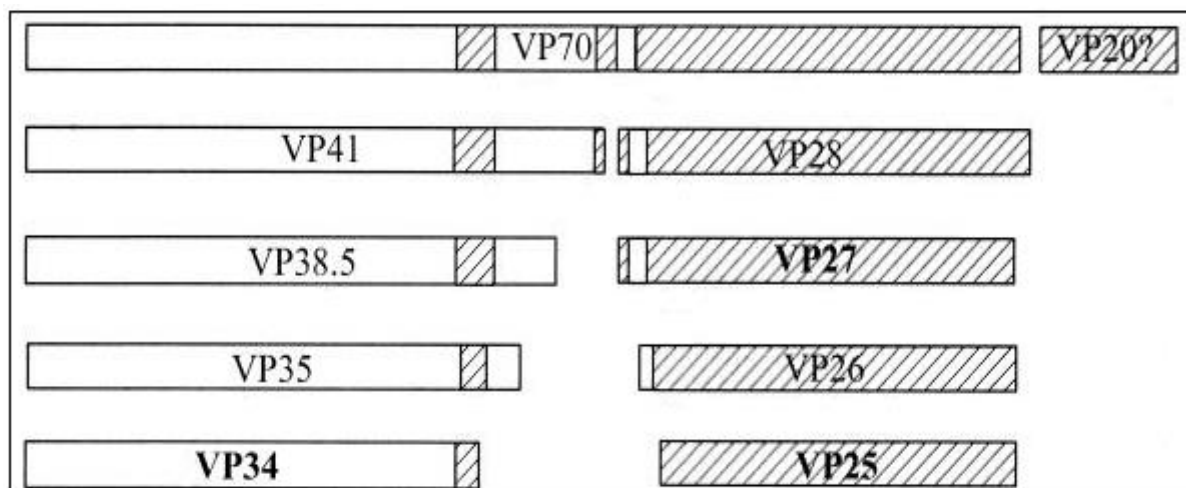


Figura 1.10 Modelo temporal do processamento proteolítico da poliproteína da fase aberta de leitura (ORF2) dos astrovírus humanos pela protease viral. As caixas listradas indicam as regiões hipervariáveis. Os produtos finais, presentes nas partículas virais infecciosas estão representadas em negrito. Adaptado de Mendez et al (2002).

1.6.2 Norovírus

Os NV reconhecem os antígenos do grupo sanguíneo (BGA) como o receptor para a adsorção viral. Os BGA são carboidratos complexos presentes nas glicoproteínas ou glicolipídeos de eritrócitos e células epiteliais das mucosas. O domínio P da proteína do capsídeo tem elementos essenciais para a união ao seu receptor celular formando dímeros que se unem aos BGA durante a formação do capsídeo (Tan et al, 2003, 2004).

O RNA genômico funciona como molde para a síntese do RNA intermediário de polaridade negativa. Posteriormente, esta fita é utilizada como molde para originar a progênie de RNA genômico de polaridade positiva, sendo a RpRd, a proteína viral implicada neste processo. Esta RpRd tem atividade de síntese *de novo* de RNA tanto do RNA genômico quanto do RNA intermediário. O RNA subgenômico é sintetizado pela transcrição do RNA genômico e, posteriormente, é traduzido no capsídeo. A

protease processa as clivagens necessárias para produzir as proteínas não estruturais. A proteína VP1 é principalmente traduzida a partir do RNA subgenômico (Asanaka et al, 2005).

A poliproteína codificada pela ORF1 é clivada pela cisteína protease em proteínas não estruturais que são necessárias para a replicação do vírus. A clivagem, que ocorre co-traducionalmente em dois dipeptídeos, origina as proteínas maduras amino-terminal (Nterm) e NTPase, assim como o precursor protéico p20VpgProPol. Posteriormente, existem duas vias possíveis de clivagem do precursor p20VpgProPol para originar as proteínas virais p20, Vpg, protease e polimerase. Em uma dessas vias a clivagem ocorre entre a região VPg e Pro originando os intermediários p20VPg e ProPol. O precursor ProPol é uma enzima bifuncional com atividade protease e polimerase (Belliot et al, 2005). Na segunda via, a clivagem ocorre entre a região Pro e Pol originando p20VpgPro e Pol. Clivagens posteriores entre p20 e VPg, e entre VPg e Pro originam as proteínas maduras p20, VPg, protease e polimerase (Figura 1.11) (Belliot et al, 2003).

O RNA genômico é empacotado nas partículas virais, com o sinal de empacotamento do RNA localizado na ORF1 ou em uma proteína não estrutural necessária para realizar este processo (Asanaka et al, 2005).

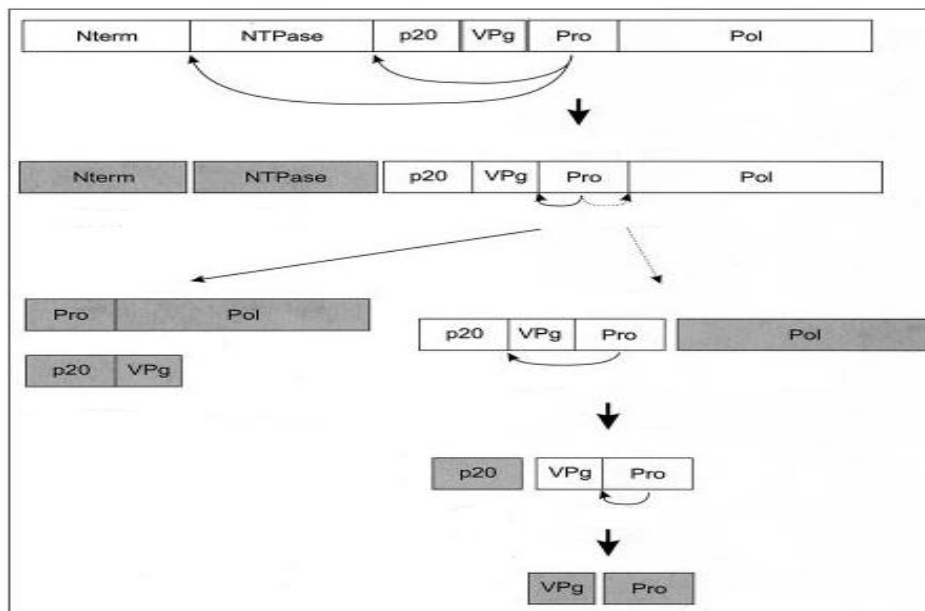


Figura 1.11 Modelo temporal do processamento proteolítico da poliproteína da fase aberta de leitura 1 (ORF1) pela protease viral. Nterm: Proteína N-terminal; NTPase: Proteína Nucleosídeo Trifosfatase; p20: Proteína p20; VPg: Proteína de União ao Genoma; Pro: Protease; Pol: Polimerase. Adaptado de Belliot et al (2003).

1.7 Patogênese e Características Clínicas

1.7.1 Astrovírus

A infecção pelo HAstV ocorre com maior frequência em crianças menores de 3 anos de idade e resulta em diarreia em 72-100% dos casos. A diarreia é autolimitada, com duração de 2 a 3 dias e, geralmente, as crianças infectadas não apresentam sangue nas fezes. Cerca de 50% dos casos apresentam dor abdominal, 33% sintomas de deficiência respiratória, 20-70% vômito, 20-25% febre e 30% algum grau de desidratação com até 5% de desidratação grave. Do total de crianças com gastroenterite aguda causada por HAstV, 6% são hospitalizadas com o período de permanência no hospital de até 6 dias (Walter & Mitchell, 2003).

Ao infectar células de adenocarcinoma de colon humano (CaCo-2) com HAstV, Guix e colaboradores (2004) detectaram características clássicas de apoptose (fragmentação do DNA, formação de corpos apoptóticos, condensação da cromatina), sugerindo que a via da caspase 8 esteja envolvida na resposta apoptótica durante a infecção viral por astrovírus. O indutor da apoptose é um domínio encontrado na proteína não estrutural P38, codificada pela ORF1a. A morte apoptótica de células infectadas parece ser necessária para uma eficiente maturação das partículas virais.

Na infecção de cordeiros por astrovírus se observa a presença do vírus nas células colunais epiteliais do intestino delgado cobrindo os dois terços apicais das microvilosidades. Os vírus também foram observados nas extremidades apicais, nos lisossomas e nos fagolisossomas dos macrófagos na lâmina própria. As partículas virais foram liberadas nas células desintegradas na luz do intestino (Gray et al, 1980).

Em infecções experimentais de perus, evidenciou-se degeneração e necrose das células epiteliais do intestino delgado. A lâmina própria apresentou infiltração, com aumento no número de células, predominantemente de linfócitos, porém com poucos macrófagos. A microvilosidade apresentou atrofia leve (Behling-Kelly et al, 2002).

1.7.2 Norovírus

As manifestações clínicas decorrentes das infecções por NV são diarreia e vômito, que podem surgir de forma abrupta ou gradual e que persistem por 3 a 5 dias após a infecção. Essas manifestações podem estar acompanhadas por náusea, câimbras abdominais, cefaléia, febre e mialgia. Geralmente os adultos desenvolvem diarreia como a principal característica da doença, enquanto que em crianças a principal característica clínica é vômito, sendo este sintoma menos freqüente em crianças menores de um ano de idade (Rockx et al, 2002; Lopman et al, 2004). Na maioria dos casos não existe a presença de sangue ou muco nas fezes que são aquosas. O período de incubação do vírus é de 12-48 horas e o de excreção pode ser de até 22 dias (Treanor & Dolin, 2000 *apud* Thornton et al, 2004).

Estudos realizados com voluntários infectados mostram que a infecção primária ocorre no intestino delgado com expansão dos vilos e encurtamento dos microvilos, provocando lesões na mucosa resultando na produção da diarreia. As náuseas e os vômitos resultam da transitória gastroparese que se resolve com o término da infecção viral. Indivíduos incapazes de manter uma hidratação (crianças menores de 5 anos e idosos) podem apresentar desidratação grave, resultando em distúrbios eletrolíticos e hospitalização. As infecções são autolimitadas e a maioria dos pacientes se recupera sem seqüelas; óbitos podem ocorrer em pacientes com desidratação grave e subnutridos (Wilhelmi et al, 2003; Thornton et al, 2004).

1.8 Resposta Imunológica do Hospedeiro

1.8.1 Astrovírus

Observações clínicas em estudos com voluntários têm demonstrado o importante papel desenvolvido pela resposta imune humoral e pelos anticorpos neutralizantes na eliminação da infecção por HAstV. A resposta celular de células T CD4 e a imunidade inata também estão envolvidas na resposta imune (Koci, 2005). É possível que a proteção contra reinfecções seja mediada pela resposta imune celular de mucosa no sítio da infecção (Molberg et al, 1998).

As proteínas estruturais são importantes alvos para a resposta imune, pois atuam na adsorção e penetração do vírus na célula. Epítomos presentes exclusivamente na VP29 são indutores de anticorpos neutralizantes (Bass et al, 1997).

1.8.2 Norovírus

Com o objetivo de avaliar a resposta imune induzida por NV, Lindesmith e colaboradores (2005) administraram uma amostra de NV GII em voluntários, observando uma produção significativa de Imunoglobulina G (IgG) sérica que apresentaram reação cruzada com outras amostras dentro do mesmo genogrupo. Entretanto não foi observada reação cruzada com amostras do NV GI. Estes indivíduos também desenvolveram resposta imune de mucosa do tipo IgA. Em relação à resposta imune celular do tipo Th1 foi observado um aumento significativo na secreção de interferon gama (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2) aumentando a ativação de macrófagos e a produção de subclasses de IgG que favorecem a opsonização viral.

Neste mesmo estudo foi demonstrada a existência de três tipos de resposta ao desafio do NV no homem: 1) resistência apesar de desafios repetidos; 2) desenvolvimento de uma imunidade protetora; 3) susceptibilidade, apesar de desafios repetidos. Os autores sugerem pelo menos dois mecanismos para a resistência ao NV: 1) resistência genética mediada por alelos codificantes para a α 1,2 fucosiltransferase (FUT2) inativos; 2) imunidade adquirida caracterizada pela rápida produção de IgA vírus-específica.

O NV se une na superfície de células epiteliais no trato gastrointestinal. A enzima FUT2 produz o carboidrato H tipo 1 na superfície das células epiteliais e nas secreções mucosas, sendo este o receptor do NV. Outras glicosiltransferases como Lewis (FUT3), enzima A e B, que determinam o fenótipo do sistema ABO sanguíneo, são encontradas nas células epiteliais e têm a capacidade de modificar a estrutura H tipo 1 presente na superfície celular ou em secreções como a saliva. As modificações por adição de uma segunda fucose pela enzima FUT3 origina o antígeno Lewis b, sendo esta estrutura ainda reconhecida pelo NV. A adição de uma N-acetilgalactosamina ou uma galactose em união α 1,3 origina o antígeno A e B, respectivamente, que reveste o epítomo H tipo 1. Os indivíduos desprovidos do receptor H tipo 1 são resistentes à infecção pelo NV. Os indivíduos do grupo sanguíneo O

são mais susceptíveis à infecção por NV, sendo os indivíduos do grupo A ou B mais resistentes (Marionneau et al, 2005).

1.9 Diagnóstico Laboratorial

1.9.1 Astrovírus

A ME foi a primeira metodologia utilizada para a detecção dos HAstV e, atualmente, vem sendo substituída pela RT-PCR, “Northern blotting” e ensaios imunoenzimáticos (EIE), já que estas técnicas apresentam maior sensibilidade. O desenvolvimento de EIEs, capazes de detectarem os oito sorotipos de HAstV, facilitaram os estudos laboratoriais demonstrando a importância epidemiológica destes vírus na gastroenterite aguda (Appleton & Higgins, 1975; Herrmann et al, 1991; Noel et al, 1995; Walter & Mitchell, 2003).

Atualmente, a RT-PCR tem sido a metodologia mais empregada na detecção dos HAstV (Walter & Mitchell, 2003). Iniciadores das regiões conservadas como a da ORF1a (Dalton et al, 2002; Guix et al, 2002) são utilizados para a detecção do vírus, enquanto outros, que foram desenhados na região 5’ e 3’ da ORF2, permitem a genotipagem dos mesmos. Alternativamente, iniciadores utilizados na detecção dos HAstV são também empregados para o sequenciamento dos amplicons para a caracterização molecular destes vírus (Noel et al, 1995; Schnagl et al, 2002; Guix et al, 2005a).

Um estudo realizado por Tai e colaboradores (2003) comparou a RT-PCR com a técnica de amplificação baseada na sequência de ácido nucléico (NASBA) não observando diferenças significativas entre as taxas de detecção da RT-PCR e da NASBA.

Recentemente, reações de amplificação e quantificação de ácido nucléico em tempo real (*real-time* PCR) têm sido descritas como as mais sensíveis para a detecção dos HAstV por apresentarem capacidade de detecção de até 0,0026 unidades infecciosas por microlitro (μ l) (Royuela et al, 2005).

1.9.2 Norovírus

O pequeno número de partículas virais com morfologia característica presente nas amostras fecais dificulta a utilização da ME como metodologia de diagnóstico para os NV. No caso da IEM, onde as amostras positivas apresentam agregados de partículas virais, a detecção dos vírus ocorre em 50% dos casos. A IEM é uma metodologia importante no diagnóstico dos calicivírus, porém não aplicável em estudos epidemiológicos (Atmar & Estes, 2001).

A expressão das proteínas VP1 e VP2 (VLP) em diferentes sistemas permitiu o desenvolvimento de EIE para a detecção de antígenos e de anticorpos (Lochridge & Hardy, 2003). Este tipo de ensaio detecta de 10^5 a 10^6 VLP/reação, tendo uma sensibilidade comparável à IEM. Este ensaio tem a vantagem de não ter reatividade cruzada com outros vírus entéricos (Atmar & Estes, 2001).

A detecção dos NV utilizando o sistema Ag-Ac (EIE) é limitada devido à grande diversidade antigênica destes vírus mesmo utilizando diferentes antígenos (VLP) simultaneamente. A baixa sensibilidade e especificidade do EIE resultam em amostras negativas que deveriam ser testadas pela RT-PCR (Gunson et al, 2003).

A RT-PCR é o ensaio diagnóstico mais sensível para a detecção dos calicivírus humanos, detectando até 100 partículas virais/mL, mesmo após a resolução da infecção aguda (Atmar & Estes, 2001; Tatsumi et al, 2002). Para a detecção do NV têm-se utilizado diferentes iniciadores desenhados em distintas regiões do genoma viral, tais como a região da RpRd e a região da junção da ORF1-ORF2, que são as mais conservadas do genoma, e a região do domínio amino-terminal da proteína capsídica (Kobayashi et al, 2000; Kageyama et al, 2003; Gallimore et al, 2004).

Recentemente, foi desenvolvido um ensaio de multiplex real-time PCR para a detecção e quantificação dos GI e GII dos NV. Os iniciadores foram desenhados na região da junção da ORF1-ORF2 e não apresentam reatividade cruzada com outros vírus entéricos (Pang et al, 2005).

1.10 Epidemiologia e Distribuição Geográfica

1.10.1 Astrovírus

Estudos baseados em voluntários demonstraram que as infecções por HAstV são adquiridas pelo contato pessoa-pessoa e pela ingestão de água e alimentos contaminados (Mitchell, 2002; Walter & Mitchell, 2003).

Estudos utilizando a RT-PCR demonstraram uma taxa de detecção de HAstV de até 27% em infecções esporádicas na comunidade e de 1,6% a 16% em crianças hospitalizadas (Gaggero et al, 1998; Ratcliff et al, 2002; Jakab et al, 2004). Estes resultados demonstram que os HAstV são importantes na etiologia da diarreia em crianças de comunidades, podendo resultar em infecções graves que necessitem atendimento médico e hospitalização (Walter & Mitchell, 2003). O vírus tem sido associado com diarreia em indivíduos imunodeprimidos, diarreia persistente e surtos diarreicos em escolas e hospitais (Glass et al, 1996; Unicomb et al, 1998).

A infecção por HAstV ocorre principalmente em crianças menores de 3 anos e naquelas com comprometimento imunológico, incluindo pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), transplantados e em oncoterapia. Crianças co-infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam quadros de gastroenterite grave (Cunliffe et al, 2002).

A frequência da gastroenterite associada aos HAstV varia de 2 a 11% nos países desenvolvidos, e de 2% a 26% naqueles em desenvolvimento (Chikhi-Brachet et al, 2002; Cunliffe et al, 2002; Dalton et al, 2002; Ratcliff et al, 2002). O genótipo 1 (HAstV-1) é o mais frequentemente detectado, os HAstV-2, -3, -4 e -5 são menos frequentes, enquanto que os HAstV-6, -7 e -8 são raramente detectados (Schnagl et al, 2002).

Um estudo realizado nos EUA durante um período de cinco anos evidenciou taxas anuais de detecção de HAstV de 5,1% a 8,9%, com a maioria dos casos ocorrendo entre março e junho. O grupo etário mais afetado foi o de crianças menores de 3 meses de idade, sendo o HAstV 1 o mais prevalente. Os pacientes com infecção por HAstV apresentaram taxas menores de desidratação (24% a 30%) quando comparados com pacientes infectados por rotavírus (41% a 57%) (Dennehy et al, 2001; Walter & Mitchell, 2003).

Na França, Belliot e colaboradores (1997) descreveram um surto de gastroenterite por HAstV-3 em estudantes de 18 a 20 anos em uma escola militar.

Em um estudo realizado na África do Sul com pacientes apresentando gastroenterite, percentuais similares na ocorrência de HAstV foram identificados tanto em adultos (3,1%) quanto em crianças menores de 5 anos (4,8%) (Pager & Steele, 2002).

Na América Latina, estudos realizados em crianças de 0 a 3 anos com diarreia aguda, relataram ocorrências de 5 a 7% em crianças de comunidades e de 2 a 5% em crianças hospitalizadas (Giordano et al, 2004). No Chile, a ocorrência do HAstV em crianças com diarreia que necessitaram assistência médica variou de 7% (nos casos de co-infecção por RV) a 16%. O HAstV-1 foi o mais frequente seguido pelos HAstV-2 e -4 (Gaggero et al, 1998).

Na Argentina a ocorrência de HAstV variou de 4% a 12%, sendo o HAstV-1 o mais frequentemente detectado, seguido pelos HAstV- 4, -2, -3 e -5. As infecções foram detectadas em crianças menores de dois anos de idade, com pico de detecção em crianças de 4 a 6 meses (Espul et al, 2004; Giordano et al, 2004).

No Brasil, alguns estudos demonstraram que a ocorrência do HAstV varia de 3% a 11% em crianças de até cinco anos de idade hospitalizadas com gastroenterite aguda, correspondendo a maioria dos casos ao HAstV-1, sendo que os HAstV-2, -3, -4 e -5 também foram detectados (Cardoso et al, 2002; Gabbay et al, 2005). Em um surto envolvendo crianças menores de 3 anos de idade com gastroenterite aguda em uma creche na cidade do Rio de Janeiro somente foi detectado o HAstV-1 em 33% dos casos (Silva et al, 2001).

O padrão de sazonalidade da incidência de HAstV é controverso e parece depender da região geográfica analisada (Walter & Mitchell, 2003). Estudos realizados na Argentina, em Botswana (África) e na Austrália não detectaram diferença significativa entre as incidências do HAstV nas distintas estações do ano (Mustafá et al, 2000; Basu et al, 2003; Giordano et al, 2004). Nas regiões de clima temperado a maioria das infecções por HAstV é detectada no inverno (Liu et al, 2004). Estudos realizados em países do continente europeu indicam maior frequência de detecção nos meses mais frios do ano (Pang et al, 2000; Guix et al, 2002; Galdiero et al, 2005). Também se têm detectado maiores ocorrências na primavera e verão, conforme observado no Paquistão (Phan et al, 2004), no Egito (Naficy et al, 2000) e no México (Guerrero et al, 1998). Neste último estudo o HAstV foi detectado entre outubro e dezembro correspondendo com a estação chuvosa (primavera-início do verão).

No Brasil alguns estudos também demonstraram dados controversos quanto à sazonalidade dos HAstV. Enquanto no estado de Goiás, Cardoso e colaboradores (2002)

observaram maior ocorrência das infecções nos meses de primavera e verão, Miranda (2004) no Rio de Janeiro demonstrou maior ocorrência das infecções nos meses de outono e inverno. Em São Luís (Maranhão), Gabbay e colaboradores (2005) não detectaram padrão de sazonalidade destas infecções.

1.10.2 Norovírus

A principal via de transmissão dos NV é fecal-oral (Figura 1.12) (Lopman et al, 2003). A infecção primária resulta da ingestão de água ou alimentos contaminados e a infecção secundária resulta do contato pessoa a pessoa devido a aerossóis de vômitos e objetos contaminados (Estes et al, 2000; Fankhauser et al, 2002).

Os NV são considerados os agentes etiológicos virais mais comuns de gastroenterites epidêmicas originadas por consumo de alimentos ou água contaminados (Brugha et al, 1999). A razão mais comum pela qual se originam os surtos envolvendo água é pela desinfecção inadequada dos efluentes de esgoto (Maunula, 2005). O consumo de organismos filtradores, tais como bivalves, que vivem em águas contaminadas, pode ser uma via importante de transmissão, pois, geralmente, estes são servidos crus originando surtos de considerável extensão (Ng et al, 2005).

A transmissão do NV é muito eficiente, com rápida dispersão durante surtos, principalmente devido à alta infecciosidade deste vírus já que um inóculo contendo de 10 a 100 vírions é suficiente para causar uma infecção. Pessoas infectadas podem transmitir o vírus após sua recuperação, pois continuam a eliminar partículas por até três semanas (Schaub & Oshiro, 2000; Rockx et al, 2002).

Os NV causam surtos de gastroenterite em comunidades de hospitais, clínicas, escolas, navios, restaurantes e militares. Os surtos afetam indivíduos de todos os grupos etários e variam de extensão atingindo pequenos grupos ou resultando em epidemias com mais de 6000 pessoas infectadas (Fankhauser et al, 1998; Moreno-Espinosa et al, 2004).

Surtos e casos esporádicos de gastroenterite aguda causados por NV podem ocorrer durante o ano todo, embora se observem diferentes padrões de sazonalidade nos hemisférios norte e sul. No norte, as gastroenterites causadas por NV são mais comuns no inverno ou na estação seca, enquanto que no sul são mais frequentes no verão (Froggatt et al, 2004; Parashar et al, 2004; Bon et al, 2005; Fretz et al, 2005).

A ocorrência de NV em casos esporádicos não apresenta diferença entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento. A taxa de detecção varia de 6% na China a 23% no Japão, sendo o GII/4 o mais frequentemente detectado mundialmente (Bon et al, 2005; Okada et al, 2005; Liu et al, 2006).

No Brasil, Parks e colaboradores (1999) analisaram casos de gastroenterite em crianças hospitalizadas menores de um ano de idade na cidade de Fortaleza (Ceará) e detectaram uma ocorrência com o mesmo número de casos pertencentes ao GI e GII. Um estudo retrospectivo realizado em uma creche no Rio de Janeiro, com crianças menores de 5 anos de idade apresentando gastroenterite aguda, evidenciou o NV do GII como responsável por três dos quatro surtos estudados com a ocorrência variando de 23% a 67% (Gallimore et al, 2004).

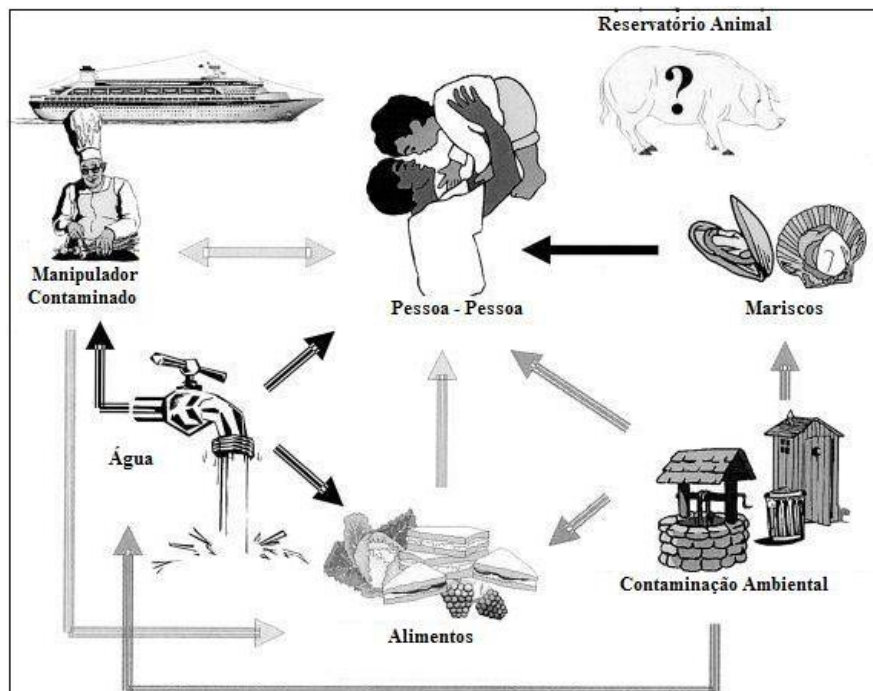


Figura 1.12 Vias de transmissão dos norovírus. Adaptado de Moreno-Espinosa et al (2004).

1.11 Prevenção e Controle

Para se determinar as medidas de controle das infecções virais responsáveis pela gastroenterite aguda é importante identificar os agentes etiológicos envolvidos nos surtos (Thornton et al, 2004). A combinação dos métodos de RT-PCR e EIE têm sido utilizadas para obter resultados rápidos em estudos epidemiológicos (Tatsumi et al, 2002).

Nos surtos de gastroenterites, a interrupção da transmissão é a principal estratégia para o controle, especialmente em hospitais e creches. A eliminação de fontes comuns de infecção, assim como a interrupção da transmissão pelo contato pessoa a pessoa são medidas efetivas para o controle das infecções. É fundamental a atenção na higiene das mãos, que devem ser lavadas com água e sabão antes e após o contato com o paciente ou com objetos que podem estar contaminados, assim como a desinfecção de superfícies contaminadas (Wilhelmi et al, 2003).

A contaminação da água utilizada para consumo ou para atividades recreacionais pode servir como fonte primária de surto, uma vez que os NV são resistentes ao tratamento com cloro, podendo permanecer infecciosos por prolongados períodos neste ambiente (Parashar & Monroe, 2001).

Os NV têm a capacidade de ser transferidos de forma eficaz de indivíduos com mãos contaminadas para até sete superfícies limpas diferentes. O uso de detergentes é pouco efetivo na eliminação da contaminação por NV, sendo necessária uma posterior aplicação da combinação hipoclorito/detergente para uma desinfecção adequada. A combinação água sanitária/detergente é suficiente para a descontaminação de superfícies (Barker et al, 2004).

Como as medidas de saneamento não são suficientes para evitar a ocorrência de gastroenterite aguda por NV, a prevenção poderia ser realizada pela utilização de uma vacina. Recentemente, VLPs recombinantes foram utilizadas para a imunização de camundongos e voluntários e a imunogenicidade avaliada pela presença de anticorpos no soro e nas fezes. As formulações orais de VLPs expressas em baculovírus e em plantas transgênicas utilizadas nestes estudos produziram resposta humoral de mucosa nos camundongos desafiados. Estes resultados representam os primeiros avanços para a obtenção de uma futura vacina anti-NV (Estes et al, 2000; Nicolier-Jamot et al, 2004; Tacket 2005).

2 RELEVÂNCIA

A gastroenterite é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em crianças, principalmente nos países em desenvolvimento. Nestes países cada criança experimenta em média de dois a três episódios de diarreia por ano. A morbidade específica de gastroenterite é definida como o número de episódios de diarreia por indivíduo por ano, enquanto a mortalidade, pela taxa de mortes causadas por diarreia como o principal sintoma. Nos últimos 50 anos, observou-se uma queda na incidência anual da mortalidade em crianças menores de cinco anos de 13,6 (1955-1979) para 4,9 (1992-2000) (Kosek et al, 2003). A redução nessa taxa resultou principalmente devido ao aumento no uso da terapia de reidratação oral, no período de aleitamento materno e nas melhorias de higiene e saneamento. Contudo, 2,5 milhões de crianças menores de 5 anos de idade morreram por diarreia na década de 1990 (Kosek et al, 2003).

O padrão de queda observado na taxa de mortalidade é diferente do padrão de estabilidade observado na taxa de morbidade, que tem permanecido elevado nas últimas quatro décadas, fazendo com que a gastroenterite infantil aguda permaneça como importante agravo em crianças (Parashar et al, 2003). É importante considerar esta alta taxa de morbidade, uma vez que os episódios de diarreia podem ter repercussão no futuro desenvolvimento físico e mental das crianças (Kosek et al, 2003).

Os RV são os principais vírus responsáveis pela gastroenterite infantil aguda em crianças. Entretanto, o desenvolvimento e aplicação de novas metodologias no diagnóstico dos HAstV e NV revelaram que estes vírus são também importantes agentes etiológicos de gastroenterites aguda. Embora diferentes estudos demonstrem a relevância destes vírus, os mesmos ainda não estão sendo investigados nos laboratórios clínicos de microbiologia. A ausência de diagnóstico para esses vírus tem subestimado a frequência e, conseqüentemente, o real impacto desses vírus nos quadros de gastroenterite infantil aguda (Greenberg et al, 1979; Herrmann et al, 1991; Lew et al, 1991; Cruz et al, 1992; Caul, 1996; Dedman et al, 1998; Foley et al, 2000; Schnagl et al, 2002).

No Brasil o papel dos RV como agente causal das gastroenterite tem sido bem estabelecido e pouco se sabe sobre a frequência de HAstV e NV, principalmente em crianças hospitalizadas (Cardoso et al, 2002; Castello et al, 2004, Costa, 2004; Gallimore et al, 2004; Gabbay et al, 2005; Santos et al, 2005). Estudos de epidemiologia molecular, determinando ocorrência, sazonalidade e genótipos circulantes permitirão determinar a importância

epidemiológica destes vírus no país e o futuro desenvolvimento de vacinas e terapias preventivas (Mustafa et al, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Determinar a ocorrência de infecções por HAstV e NV, utilizando metodologias moleculares para detecção e caracterização destes vírus, em crianças com gastroenterite aguda internadas em três hospitais da rede pública do município do Rio de Janeiro, no ano de 2004.

3.2 Específicos

- Detectar pela RT-PCR, HAstV e NV em amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda.
- Determinar a frequência de co-infecções pelos principais agentes virais responsáveis pela gastroenterite aguda (RV, HAstV, NV e AdV).
- Correlacionar a frequência de HAstV e NV detectados na população estudada com grupo etário, sexo, manifestações clínicas e sazonalidade.
- Determinar os genótipos dos vírus detectados pelo seqüenciamento parcial do genoma e correlacioná-los com aqueles circulantes no Brasil e no mundo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Definição de Caso de Gastroenterite

Casos de gastroenterite aguda foram definidos clinicamente pela ocorrência de três ou mais evacuações líquidas ou de pouca consistência em um período de 24 horas, acompanhadas ou não de dois ou mais episódios de vômito ao dia (Rodriguez-Baez et al, 2002).

4.1.2 Amostras Clínicas

Foram estudados 318 casos de gastroenterite em crianças internadas nos seguintes hospitais da cidade do Rio de Janeiro: Hospital Municipal Souza Aguiar ($n=88$), Hospital Municipal Salles Neto ($n=101$) e Hospital Municipal Jesus ($n=129$), no período de janeiro a dezembro de 2004.

As amostras fecais obtidas 24 horas após a internação, acompanhadas da Ficha de Informações Clínicas e Epidemiológicas (anexo 1), foram enviadas ao Laboratório de Virologia Comparada, no Departamento de Virologia, IOC, FIOCRUZ e mantidas sob refrigeração entre 2 – 8 °C até o momento da análise.

Todas as amostras fecais testadas foram previamente testadas para detecção de RV e AdV entéricos pelas técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e ensaio imunoenzimático (EIARA).

4.1.3 Amostras Controles

Amostras padrões de HAstV e NV foram gentilmente cedidas pelo Dr. Roger Glass, “Viral Gastroenteritis Section”, CDC, Atlanta, EUA. Estas amostras foram anteriormente

utilizadas na implementação dos protocolos de RT-PCR. Neste estudo, amostras fecais previamente analisadas e tipadas para HAstV e NV no Laboratório de Virologia Comparada foram utilizadas como padrões (controles positivos).

4.1.4 Comitê de Ética

Este estudo obteve aprovação pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos Hospitais envolvidos de acordo com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), e pelo Comitê de Ética Institucional (CEP/Fiocruz), onde foi aprovado sob o nº 0011.0.011.009-04.

4.1.5 Soluções

4.1.5.1 Tampão Tris/HCl/Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2

Tris -hidroximetil-tris-aminometano (Invitrogen [®])	1,21 g
Cloreto de Cálcio -CaCl ₂ - 0,0015M (Vetec [®])	0,22 g
Água destilada q.s.p.	1000,00 mL

Em “becker” adicionar os reagentes, homogeneizar até a completa diluição e ajustar o pH a 7,2 com ácido clorídrico (HCl) PA (Vetec Química Fina Ltda.) antes de completar o volume final. Aliquotar, autoclavar a 121°C/20 minutos e conservar a 4 °C.

4.1.5.2 Sílica

Dióxido de silício (SIGMA [®])	60,00 g
Água destilada q.s.p.	500,00 mL

Homogeneizar e deixar a sílica sedimentar por 24 horas. Desprezar 430 mL do sobrenadante por sucção e ressuspender a sílica em 500 mL de água destilada, sedimentar por 5 horas e desprezar 440 mL do sobrenadante. Adicionar 600 µL de ácido clorídrico (Merck) a

37% para ajustar a pH 2,0. Separar alíquotas de 10 mL em frascos de cor âmbar, autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

4.1.5.3 EDTA 0,2M pH 8,0

EDTA -ácido etilenodiamino tetracético- (SIGMA®)	37,22 mg
Água destilada q.s.p.	500,00 mL

Ajustar a pH 8,0 com NaOH 1M antes de completar o volume final.

4.1.5.4 Tris-HCl 0,1M pH 6,4

Tris (hidroximetil-tris-aminometano) (SIGMA®)	12,11 g
Água destilada q.s.p.	1000,00 mL

Ajustar a pH 6,4 com HCl PA (Vetec) antes de completar o volume final.

4.1.5.5 Tampão L6

Isotiocianato de guanidina (Invitrogen®)	120,00 g
Triton X-100 (SIGMA®)	2,60 g
EDTA 0,2M pH 8,0 (SIGMA®)	22,00 mL
Tris-HCl 0,1M pH 6,4 (SIGMA®) q.s.p	100,00 mL

Adicionar os reagentes a um “becker”, homogeneizar com agitador magnético em banho-maria a 56°C até completa dissolução e conservar a temperatura ambiente em frasco âmbar.

4.1.5.6 Tampão L2

Isotiocianato de guanidina (Invitrogen®)	120,00 g
Tris-HCl 0,1M pH 6,4 (SIGMA®) q.s.p.	100,00 mL

Adicionar os reagentes a um “becker”, homogeneizar com agitador magnético em banho-maria a 56°C e conservar a temperatura ambiente em frasco âmbar.

4.1.5.7 Iniciadores

O quadro 4.1 apresenta as seqüências, a localização do genoma dos iniciadores e o número de pares de bases dos amplicons gerados pela técnica de reação em cadeia pela polimerase.

Quadro 4.1 Iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase para amplificação do genoma de astrovírus humano e norovírus.

Vírus	Iniciadores	Seqüência 5' → 3'	Região e posição no genoma	Amplicons (pb)
HAstV	Mon 269 (+)	CAA CTC AGG AAA CAG GGT GT	ORF2 (4526– 4545)	449
	Mon 270 (-)	TCA GAT GCA TTG TCA TTG GT	ORF2 (4955– 4974)	
NV	Mon 432 ^a (+)	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	ORF1 (5093-5114)	213
	Mon 434 ^a (-)	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	ORF1 (5285-5305)	
	Mon 431 ^b (+)	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	ORF1 (5093-5114)	
	Mon 433 ^b (-)	GGA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	ORF1 (5285-5305)	

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

4.1.5.8 Gel de agarose a 1,5%

Agarose (Gibco-BRL)	1,20 g
Tampão TBE (Gibco-BRL)	80,00 mL

Dissolver por aquecimento em forno de microondas e resfriar até 50°C e verter na cuba de eletroforese.

4.1.5.9 Solução de brometo de etídio

Brometo de etídio 10 mg/mL (Invitrogen®)	15 µL
Água destilada q.s.p.	300,00 mL

Adicionar o brometo de etídio à água, homogeneizar suavemente e conservar a temperatura ambiente evitando a incidência direta da luz.

4.2 MÉTODOS

A figura 4.1 apresenta o fluxograma dos procedimentos realizados para a detecção e caracterização molecular de HAstV e NV investigados neste trabalho a partir da obtenção das amostras fecais nos hospitais.

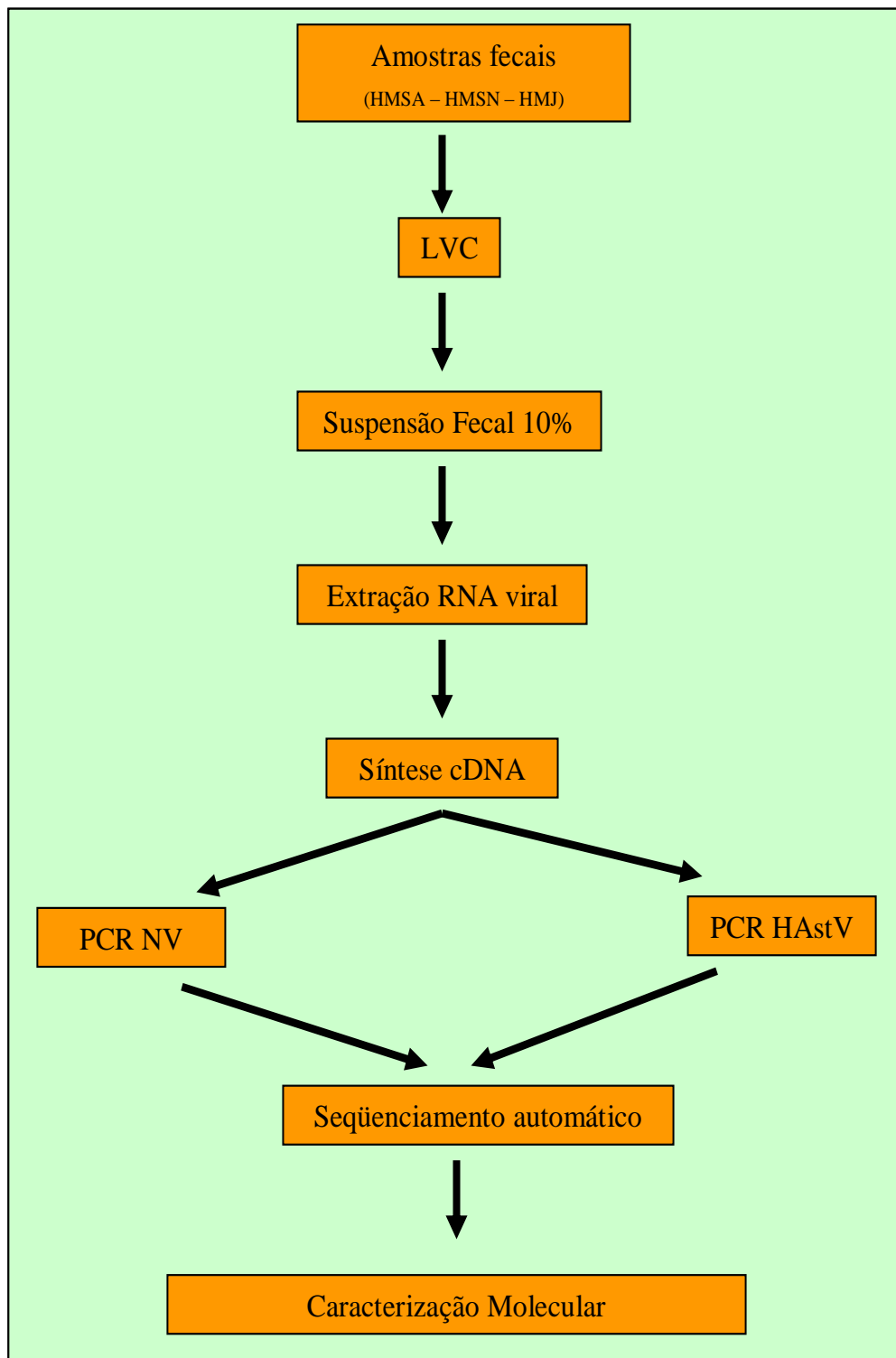


Figura 4.1 Fluxograma ilustrando os procedimentos para detecção e caracterização molecular de Astrovírus humanos (HAstV) e Norovírus (NV) a partir das amostras fecais de crianças hospitalizadas no município do Rio de Janeiro. HMSA: Hospital Municipal Souza Aguiar; HMSN: Hospital Municipal Salles Neto; HMJ: Hospital Municipal Jesus; LVC: Laboratório de Virologia Comparada (IOC-Fiocruz). cDNA: DNA complementar. PCR: reação em cadeia pela polimerase.

4.2.1 Suspensão fecal a 10%

Adicionou-se 5 g de amostra fecal em 5 mL de tampão Tris/HCl/Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2, e após homogeneização em vórtex por 10 segundos e centrifugação a 3000 x g por 20 minutos, coletou-se 4 mL do sobrenadante que foi estocado a -20°C até o momento da análise.

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

Adicionou-se 400 µL de suspensão fecal a 10% em 800 µL de tampão L6, após homogeneização em vórtex por 10 segundos incubou-se a 56°C por 10 min. Acrescentou-se 15 µL de sílica, se homogeneizou em vórtex por 10 segundos e colocou-se em plataforma orbital com agitação lenta por 20 minutos. Centrifugou-se a 16.000 x g por 1 minuto e se descartou o sobrenadante em solução de NaOH 10N. Lavou-se o sedimento com 500 µL de tampão L2, 500 µL de etanol 70% gelado, e 500 µL de acetona PA gelada, intercalando cada lavagem com homogeneização em vórtex, centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto e decantação do sobrenadante. Secou-se a sílica em banho-maria a 56°C por 15 minutos com tampas de banho maria e microtubo abertas. Resuspendeu-se a sílica em 60 µL de água ultra pura (GIBCO BRL), e após homogeneização em vórtex por 10 segundos incubou-se a 56°C por 15 minutos. Acrescentou-se 1 µL (40 U) de inibidor de RNase (GIBCO BRL), se homogeneizou em vórtex por 10 segundos e centrifugou-se a 16.000 x g por 4 minutos. Coletou-se 45 µL do sobrenadante e estocou-se a -70°C.

4.2.3 Extração do RNA viral pelo kit comercial “QIAamp® Viral RNA Mini Kit”, QIAGEN™ (Valencia, CA, USA)

A extração do RNA viral das amostras fecais que apresentaram amplicons inespecíficos no gel da eletroforese foi realizada segundo as recomendações do fabricante.

4.2.4 Reação de transcrição reversa para a obtenção de cDNA.

A síntese do cDNA a partir do RNA extraído se realizou utilizando o iniciador randômico pd(N)₆ (Amersham Biosciences, USA).

Adicionou-se 2 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) a 10 µL de RNA extraído e se incubou a 97 °C por 7 minutos. Colocou-se em banho de gelo por 2 minutos e após a adição de 38 µL da mistura de reagentes (RT) (Quadro 4.2), se incubou a 42°C por 1 hora e 95°C por 10 minutos. Estocou-se o produto a 4°C até o momento da PCR.

Quadro 4.2 Reagentes utilizados na reação da Transcrição Reversa (RT) para a obtenção de cDNA de astrovírus humanos e norovírus a partir do RNA viral extraído.

Reagente	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O livre de DNAase / RNAase (GIBCO BRL)	-	23,5 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen [®])	10X	5 µL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (GIBCO BRL)	2,5 mM	4 µL
MgCl ₂ (Invitrogen [®])	50 mM	2,5 µL
RT Superscript III [™] (Invitrogen [®])	200 U/µL	1 µL
pd(N) ₆ (Amersham Biosciences)	50 unidades (A ₂₆₀)	2 µL

4.2.5 Detecção molecular de astrovírus humano e norovírus pela técnica de reação em cadeia pela polimerase

Para a detecção dos HAstV e NV foram utilizados os protocolos descritos por Noel et al. (1995) e pelo CDC (2004), respectivamente. Estes protocolos foram modificados para otimizar a reação de PCR segundo as condições do laboratório.

Para a reação de PCR do HAstV foram adicionados 10µL do produto da reação de transcrição reversa (cDNA) a 15µL de mistura de reagentes (Quadro 4.3). Após uma etapa de desnaturação a 94°C por 2 minutos foram realizados 40 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguida de uma etapa final de alongação a 72°C por 10 minutos.

Quadro 4.3 Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase para amplificação de astrovírus humanos.

Reagentes	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (GIBCO BRL)	-	7,2 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen®)	10X	2,5 µL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (GIBCO BRL)	2,5 mM	2 µL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50 mM	1 µL
Taq DNA polimerase (Invitrogen®)	5 U/µL	0,3 µL
Mistura Mon 269 – Mon 270	20µM	2 µL

Para a reação de PCR dos NV adicionou-se 10µL de cDNA a 15µL de mistura de reagentes (Quadro 4.4). Após uma etapa de desnaturação a 94°C por 3 min, a PCR consistiu de 40 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto e 60°C por 30

segundos. A última etapa foi de alongação a 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram estocados a 4°C até o momento da análise.

Quadro 4.4 Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para amplificação de norovírus.

Reagentes	Concentração	Volume
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (GIBCO BRL)	-	9,1 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen®)	10X	2,5 µL
dXTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (GIBCO BRL)	2,5 mM	2 µL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50 mM	0,8 µL
Taq DNA polimerase (Invitrogen®)	5 U/µL	0,3 µL
Mistura Mon 431 - Mon 432 - Mon 433 - Mon 434	100µM	0,3 µL

4.2.6 Análise dos amplicons por eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese (100 volts por 1 hora) em gel de agarose (GIBCO BRL) a 1,5% em tampão TBE 1X (GIBCO BRL). Dois µL do corante azul de bromofenol 10X (0,3% azul de bromofenol, 65%, sacarose, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 - Invitrogen®) foi adicionado a 10 µL do produto da PCR. Para identificar o tamanho do amplicon se utilizou um padrão de peso molecular de 100 pb (GIBCO BRL). O gel foi submerso em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 20 minutos e posteriormente, visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (Labnet). A imagen foi registrada em sistema de captura de imagem (BioImaging Systems) utilizando o programa Labworks 4.0.

Foram consideradas positivas para HAstV e NV, as amostras que apresentaram amplicons com 449 e 213 pares de bases, respectivamente.

Controles positivos e negativos foram introduzidos durante todos os procedimentos deste estudo. Todos os cuidados e precauções para o trabalho com metodologia de amplificação foram estritamente seguidos, sendo cada etapa realizada em áreas distintas.

4.2.7 Seqüenciamento parcial do genoma viral

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

Para o seqüenciamento direto dos produtos amplificados e purificados foi utilizado o kit comercial “Big Dye Terminator® v1.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, CA, USA) e os mesmos iniciadores utilizados nas reações de amplificação genômica (HAstV - 2µM, NV – 10 µM) (Quadro 4.5).

Quadro 4.5 Reagentes utilizados na reação de seqüenciamento para caracterização molecular de astrovírus humanos e norovírus.

Reagente	Volume
DNA	25 ng
Tampão de seqüenciamento (5X)	2 µL
Big Dye	2 µL
Iniciador	2 µL
H ₂ O livre de DNAase/RNAase (GIBCO BRL) q.s.p.	10 µL

Para a purificação das reações de seqüenciamento, colunas CENTRI-SEP (Princeton Separations, CA, USA) foram utilizadas conforme orientação do fabricante.

Utilizou-se o seqüenciador automático modelo 3100 (Applied Biosystems) para obter os eletroferogramas e o site BioMOL do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (<http://adenina.biomol.unb.br>) para a análise da qualidade das seqüências.

4.2.8 Análise filogenética das seqüências

O programa “BioEdit Sequence Alignment Editor” (Hall, 1999) foi utilizado no alinhamento das seqüências obtidas. As seqüências dos protótipos dos diferentes genótipos de HAstV e NV, e outras provenientes de diferentes países do mundo foram resgatadas do “Entrez Pubmed – GenBank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar>) para análise (Quadros 4.6 e 4.7).

A análise filogenética das seqüências foi realizada utilizando o programa MEGA 2 versão 2.1 (Kumar et al, 2001) e a distância genética calculada pelo modelo Kimura 2-parâmetros, utilizando o método “neighbor-joining” com “bootstrap” de 1000 réplicas.

Quadro 4.6 Protótipos de astrovírus humanos (HAstV), astrovírus de peru (TAstV) e norovírus (NV) resgatados do “Entrez Pubmed - GenBank” utilizados neste estudo.

Vírus	Genogrupo	Genótipo	Número de Acesso
HAstV	-	1	L23513
HAstV	-	2	L13745
HAstV	-	3	L38505
HAstV	-	4	L38506
HAstV	-	5	U15136
HAstV	-	6	L38507
HAstV	-	7	L38508
HAstV	-	8	Z66541
TAstV	-	-	NC002470
NV	I	1	M87661
NV	I	2	L07418
NV	I	3	U04469
NV	I	4	AB042808
NV	I	5	AF414406
NV	I	6	AF093797
NV	II	1	U07611
NV	II	2	X81879
NV	II	3	U02030
NV	II	4	X76716
NV	II	5	AF414423
NV	II	6	AF414407
NV	II	7	AF414409
NV	II	9	AY038599
NV	II	10	AF493226
NV	II	11	AB074893
NV	II	12	AF414420
NV	II	16	AF493209
NV	III	1	AJ011099
NV	IV	1	AF414426

Quadro 4.7 Origem, genótipo, ano de obtenção e número de acesso das seqüências de astrovírus humano (HAstV) resgatadas do “Entrez Pubmed – GenBank”.

País	Genótipo	Ano	Número de acesso
África do Sul	8	-	AF292073
Argentina	1	1995/1998	AY324858
Argentina	2	1995/1998	AY324857
Argentina	4	1995/1998	AY324854
Austrália	1	1995/1998	AF175254
Austrália	1	1995	U49216
Austrália	4	1994	U49218
Austrália	8	1995/1998	AF175261
Brasil (DF)	1	1996	DQ139826
Brasil (DF)	2	1996	DQ139830
Brasil (DF)	2	2001	DQ139829
Brasil (GO)	1	2001	DQ139828
Brasil (GO)	8	1999	DQ139832
Brasil (MA)	1	1997/1999	DQ071651
Brasil (MA)	2	1997/1999	DQ071648
Brasil (MA)	4	1997/1999	DQ071655
Brasil (MS)	1	2003	DQ139825
Brasil (MS)	1	2003	DQ139827
Colômbia	1	1995/1999	AF211962
Colômbia	1	1997/1999	AF211964
Colômbia	2	1997/1999	AF211959
Colômbia	4	1997/1999	AF211957
Espanha	8	1997/2000	AF348798
Venezuela	1	1994/1995	AF211956
Venezuela	4	1994/1995	AF211952

4.2.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa EpiInfo versão 3.3.2. (<http://www.cdc.gov/epiinfo>). Foi utilizado o método de Quiquadrado, considerando o nível de significância estatístico de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Detecção de astrovírus humanos e norovírus pela reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa

A tabela 5.1 apresenta os resultados de 318 casos analisados pela técnica de RT-PCR para detecção de NV e HAstV de acordo com a origem dos casos. Um ou mais vírus (NV e/ou HAstV) foram detectados em 34% (108/318) dos casos estudados, sendo 65 (20,4%) NV e 43 (13,5%) HAstV. A análise conjunta destes resultados com aqueles obtidos previamente para detecção de RV e AdV (Costa, 2004; dados não publicados LVC) demonstrou a ocorrência de 30 co-infecções, representando 9,4% do total de casos estudados conforme descrito na tabela 5.2.

Tabela 5.1 Detecção de astrovírus humano (HAstV) e norovírus (NV) pela reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa em 318 casos de gastroenterite aguda em crianças hospitalizadas de acordo com a origem das amostras.

Local de coleta	Nº casos estudados	Nº casos positivos (%)			
		HAstV		NV	
Hospital Municipal Jesus	129	12	(9,3)	25	(19,4)
Hospital Municipal Souza Aguiar	88	10	(11,4)	10	(11,4)
Hospital Municipal Salles Neto	101	21	(20,8)	30	(29,7)
Total	318	43	(13,5)	65	(20,4)

Tabela 5.2 Casos de infecções mistas por astrovírus humanos (HAstV), norovírus (NV) e rotavírus (RV) em 318 casos de gastroenterite aguda provenientes de crianças hospitalizadas no município do Rio de Janeiro.

Co-infecção	Total de amostras (%)
HAstV + NV	3 (0,9)
HAstV + RV	16 (5,0)
HAstV + NV + RV	3 (0,9)
NV + RV	8 (2,5)
Total	30 (9,4)

Os produtos da amplificação pela técnica de RT-PCR das amostras positivas para HAstV e NV estão ilustrados nas figuras 5.1 e 5.2, respectivamente.

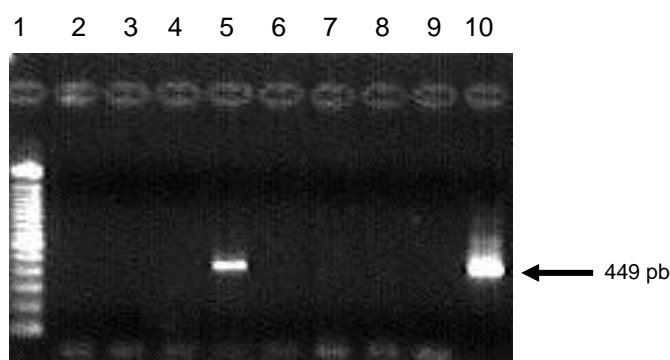


Figura 5.1 Eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa para a detecção de astrovírus humano.

Linha 1: marcador de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen®); linhas 2, 3, 4, 6, 7 e 8: amostras negativas; linha 5: amostra positiva; linha 9: controle negativo; linha 10: controle positivo.

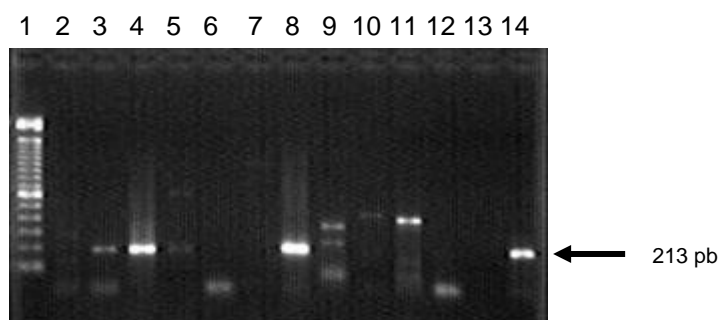


Figura 5.2 Eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa para a detecção de norovírus. Linha 1: marcador de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen®); linhas 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11 e 12: amostras negativas; linha 3,4,8: amostras positivas; linha 13: controle negativo; linha 14: controle positivo.

As infecções por HAstV foram detectadas em amostras fecais de crianças de todos os grupos etários, sendo o maior número de casos (16/43 -37,2%) detectado no grupo etário de 0 a 6 meses de idade (Tabela 5.3). Neste grupo etário foi detectada maior ocorrência de HAstV no sexo feminino ($p < 0,05$), enquanto que no grupo etário de 7 a 12 meses de idade, a maior ocorrência de infecções foi observada no sexo masculino ($p < 0,05$). Nos demais grupos etários não foram detectadas diferença significativa entre os sexos.

NV também foi detectado em amostras fecais de crianças pertencentes a todos os grupos etários. Porém, o maior número de casos foi observado em crianças de 0 a 12 meses de idade (32/65 - 49.2%). Não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os sexos em todos os grupos etários nas infecções causadas por NV ($p > 0,05$).

Tabela 5.3 Distribuição por grupo etário e sexo de casos de infecções por astrovírus humano (HAstV) e norovírus (NV) em crianças com gastroenterite aguda hospitalizadas no município do Rio de Janeiro.

Grupo etário ^a	Gênero					
	Masculino			Feminino		
	Nº de casos estudados	HAstV (%)	NV (%)	Nº de casos estudados	HAstV (%)	NV (%)
0 - 6	43	5 (12)	8 (19)	37	11 (30)	7 (19)
7 - 12	47	8 (17)	7 (15)	37	1 (3)	10 (27)
13 - 24	38	5 (13)	7 (18)	28	3 (11)	3 (11)
25 - 60	22	3 (14)	2 (9)	13	1 (8)	5 (38)
> 60	15	1 (7)	1 (7)	8	1 (13)	3 (38)
SI	22	3 (14)	7 (32)	8	1 (13)	5 (63)
Total	187	25 (13)	32 (17)	131	18 (14)	33 (25)

^a: em meses; SI: Sem Informação.

A análise de distribuição de casos de co-infecções mostrou que 46,7% (14/30) ocorreram em crianças de até 6 meses de idade (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 Distribuição por grupo etário e sexo de casos de infecção mista de astrovírus humanos (HAstV), norovírus (NV) e rotavírus (RV).

Grupo Etário ^a	Tipo de infecção mista				Total
	HAstV + NV	HAstV + RV	RV + NV	RV + HAstV + NV	
0 – 6	2	8	3	1	14
7 – 12	-	5	3	-	8
13 -24	-	2	1	1	4
25 – 60	-	-	-	-	-
> 60	1	-	-	-	1
SI	-	1	1	1	3
Total	3	16	8	3	30

^a: em meses; SI: Sem Informação

Embora o gráfico da distribuição por grupo etário das infecções demonstre a importância dos HAstV em crianças de até 6 meses de idade e de NV no grupo de 0 a 12 meses, a análise cumulativa demonstra que cerca de 80% das infecções por esses vírus ocorrem até os 2 anos de idade (Figuras 5.3 e 5.4).

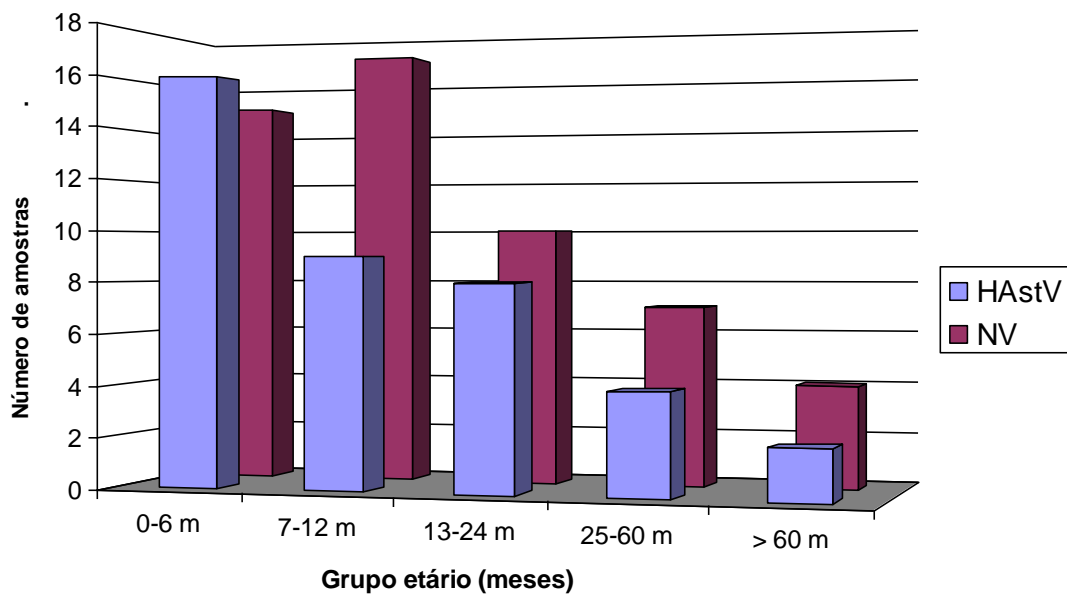


Figura 5.3 Distribuição por grupo etário de casos de infecção por astrovírus humanos (HAsV) e norovírus (NV) em crianças com gastroenterite aguda hospitalizadas no município do Rio de Janeiro.

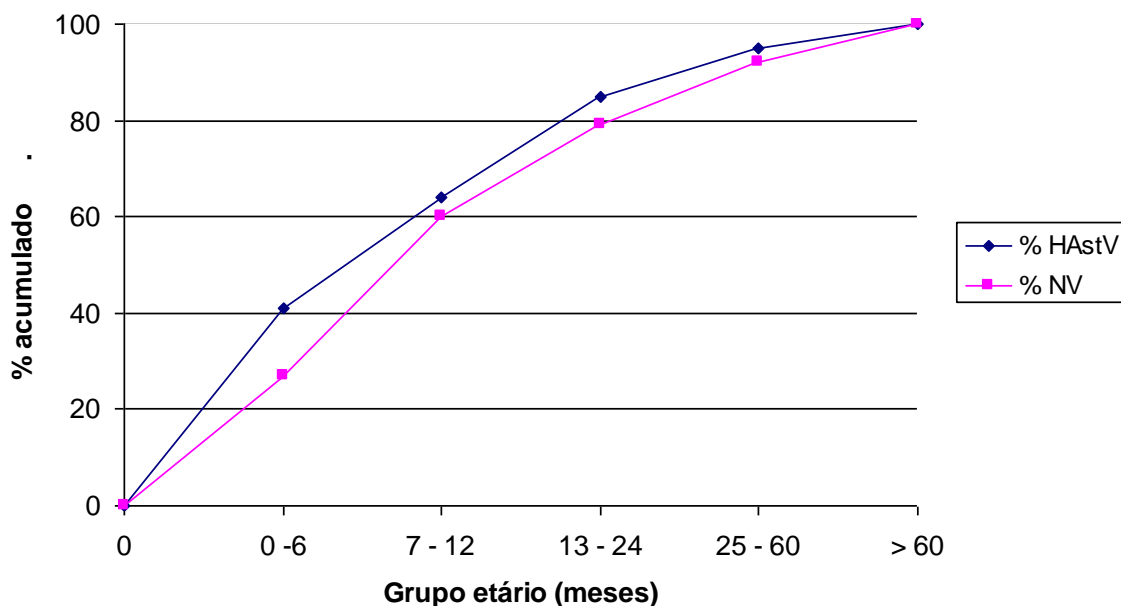


Figura 5.4 Percentual acumulado do grupo etário das infecções causadas por astrovírus humano (HAsV) e norovírus (NV).

5.2 Distribuição mensal das infecções por astrovírus humanos e norovírus

As infecções por NV foram detectadas durante o ano de 2004, com exceção do mês de dezembro, com maior frequência nos períodos de março a maio e de setembro a outubro (Figura 5.5).

As infecções por HAstV foram detectadas com maior frequência durante o período de março a maio. Nos demais meses observou-se uma pequena taxa de detecção (Figura 5.5).

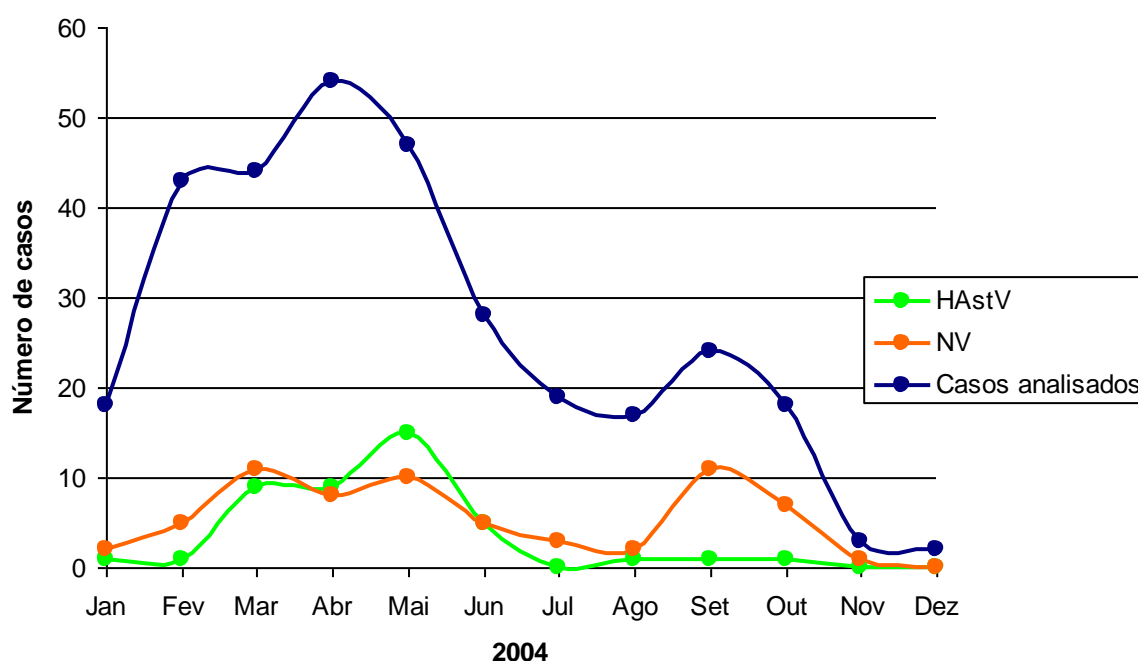


Figura 5.5 Distribuição mensal de casos de gastroenterite aguda por astrovírus humanos (HAstV) e norovírus (NV) em crianças hospitalizadas no município do Rio de Janeiro, 2004.

Dados de variáveis climáticas, tais como temperatura média e índice pluviométrico, fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia do Rio de Janeiro (INMET-RJ), foram relacionados com a detecção de HAstV e de NV. Esta análise demonstrou aumento na positividade de infecções por HAstV em períodos com queda na temperatura média e no índice pluviométrico (Figura 5.6).

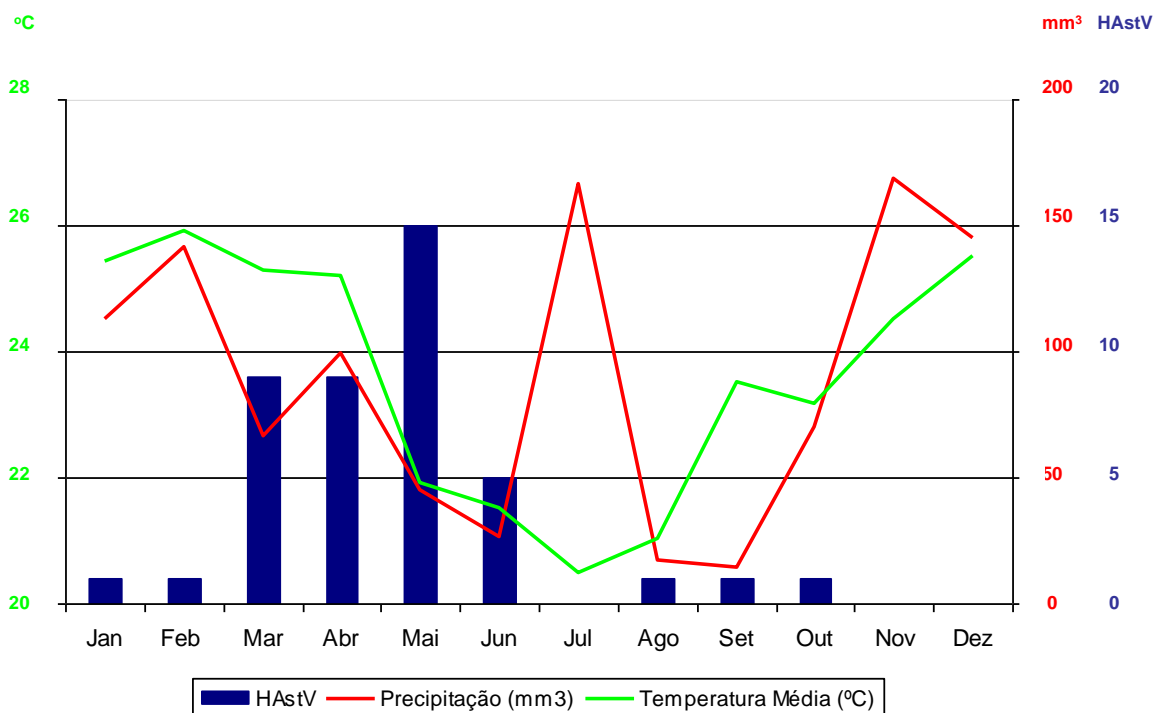


Figura 5.6 Distribuição mensal de casos de gastroenterite infantil aguda por astrovírus humanos (HAstV) e valores médios de temperatura e precipitação no município do Rio de Janeiro, 2004.

A análise destas variáveis climáticas com a frequência de detecção dos NV revelou a existência de uma relação inversamente proporcional entre esta frequência e os índices pluviométricos. O maior número de casos positivos foi relacionado com quedas importantes nas precipitações, associando os NV aos períodos secos (Figura 5.7).

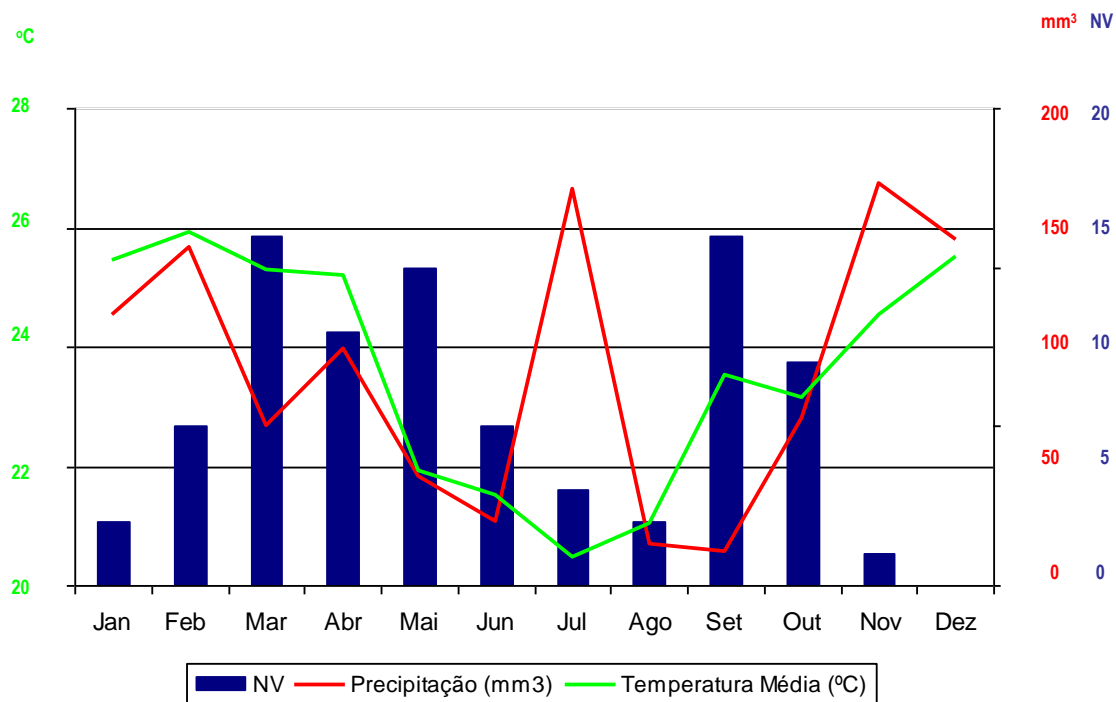


Figura 5.7 Distribuição mensal de casos de gastroenterite infantil aguda por norovírus (NV) e valores médios de temperatura e precipitação no município do Rio de Janeiro, 2004.

5.3 Manifestações clínicas associadas às infecções por astrovírus humanos e

norovírus

Na tabela 5.5 estão descritas as manifestações clínicas dos casos de gastroenterite de acordo com o agente etiológico. Todas as crianças envolvidas neste estudo apresentaram algum grau de desidratação, motivo pelo qual necessitaram de hospitalização. O vômito foi associado 2,6 vezes mais às crianças infectadas por RV, quando comparado com aquelas RV negativo, e 3,9 mais que as NV positivas. A febre teve uma associação positiva de 5,9 com RV quando foi comparada com NV e de 2,6 quando comparada com as crianças que foram RV negativo. Foi determinada uma associação positiva entre NV e tosse, este vírus teve uma associação 2,25 vezes maior que RV. Nas crianças que apresentaram sangue nas fezes, aquelas que eram HAstV positivo tiveram uma associação 6 vezes maior que as infectadas por RV.

Nos casos de tripla-infecção observou-se que uma criança apresentou apenas sintomas respiratórios, tais como tosse e coriza, outra apresentou vômito e muco nas fezes e uma delas não apresentou nenhuma manifestação clínica além do quadro de gastroenterite.

Tabela 5.5 Manifestações clínicas observadas em crianças com infecção por astrovírus humano (HAstV), norovírus (NV), rotavírus (RV) e co-infecções hospitalizadas no município do Rio de Janeiro, 2004.

Manifestações Clínicas ^a	Vírus					
	HAstV (%)	NV (%)	HAstV e NV	HAstV e RV	NV e RV	HAstV e RV e NV
Vômito	10 (47,6)	17 (33,3)	1	9	2	1
Febre	8 (38,1)	11 (21,6)	1	9	4	0
Muco	5 (23,8)	8 (15,7)	0	3	0	1
Sangue nas fezes	4 (19,1)	3 (5,9)	0	1	2	0
Tosse	7 (33,3)	26 (51,0)	1	10	3	1
Coriza	5 (23,8)	13 (25,5)	1	10	3	1

^a Todas as crianças ($n=318$) apresentavam diarreia e desidratação, que foram os critérios de inclusão utilizados.

5.4 Caracterização molecular dos astrovírus humanos e norovírus

O seqüenciamento parcial do genoma foi realizado em 35 amostras positivas para HAstV para a caracterização dos genótipos circulantes. Não foi possível realizar o seqüenciamento das outras 8 amostras devido à perda de DNA na purificação. A análise filogenética destas amostras juntamente com os protótipos dos 8 genótipos de HAstV descritos na literatura identificou 25 (71,4%) HAstV-1, 6 (17,1%) HAstV-2, 3 (8,6%) HAstV-8 e 1 (2,9%) HAstV-4 (Figura 5.8).

A tabela 5.6 apresenta o número de registro das amostras de acordo com o número de acesso no “GenBank”, mês de coleta, hospital de origem e genótipo.

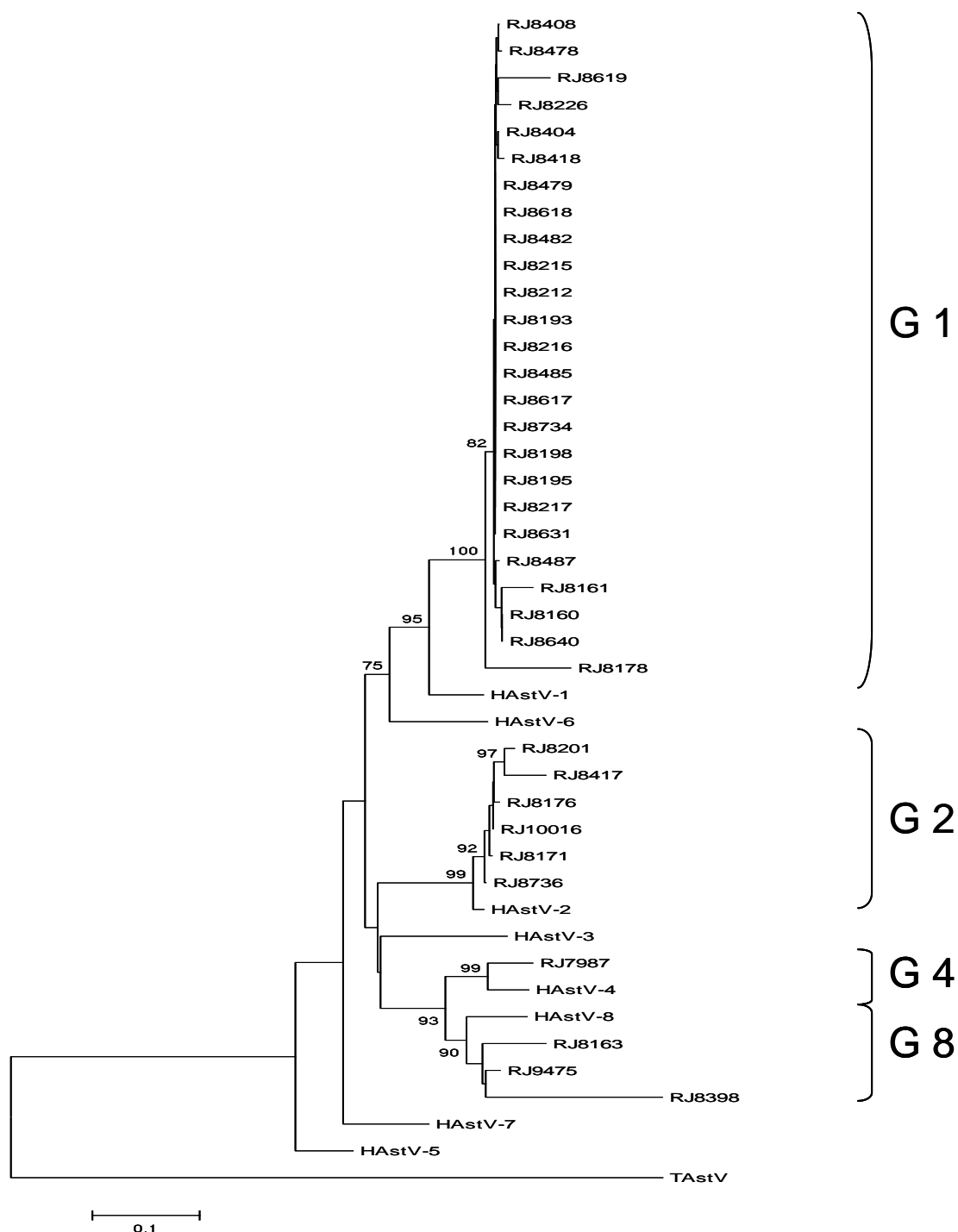


Figura 5.8 Árvore filogenética obtida a partir da análise de 348 nucleotídeos (nt 4574 - 4921) da região (ORF2) que codifica para a proteína do capsídeo do astrovírus humano (HAsV) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro. Os protótipos de HAsV estão indicados pelo número do genótipo (Exemplo: HAsV-1). As amostras seqüenciadas neste trabalho estão representadas como RJ seguido pelo número de registro no Laboratório de Virologia Comparada (Exemplo: RJ8201). G: Genótipo. TAsV: astrovírus de peru.

Tabela 5.6 Amostras de astrovírus humano (HAstV) utilizadas na análise filogenética de acordo com genótipo, hospital de origem, mês, e número de acesso do “GenBank”.

Amostra	Genótipo	Hospital	Mês	Número de acesso
7987	4	HMSA	Fevereiro	DQ381505
8160	1	HMSA	Março	DQ381480
8161	1	HMSA	Março	DQ381493
8163	8	HMSA	Março	DQ381507
8171	2	HMSA	Março	DQ381501
8176	2	HMSN	Março	DQ381499
8178	1	HMSN	Março	DQ381490
8193	1	HMSN	Março	DQ381481
8195	1	HMSN	Março	DQ381482
8198	1	HMSN	Abril	DQ381489
8201	2	HMJ	Abril	DQ381502
8212	1	HMJ	Abril	DQ381491
8215	1	HMSN	Abril	DQ381474
8216	1	HMSN	Abril	DQ381492
8217	1	HMSN	Abril	DQ381483
8226	1	HMJ	Abril	DQ381494
8398	8	HMSN	Abril	DQ381508
8404	1	HMJ	Abril	DQ381495
8408	1	HMSA	Maiο	DQ381475
8417	2	HMSA	Maiο	DQ381503
8418	1	HMSA	Maiο	DQ381496
8478	1	HMJ	Maiο	DQ381497
8479	1	HMJ	Maiο	DQ381498
8482	1	HMSN	Maiο	DQ381484
8485	1	HMSN	Maiο	DQ381485
8487	1	HMSN	Maiο	DQ381486
8617	1	HMSN	Maiο	DQ381476
8618	1	HMSN	Maiο	DQ381477
8619	1	HMSN	Maiο	DQ381478
8631	1	HMSN	Junho	DQ381487
8640	1	HMSA	Junho	DQ381488
8734	1	HMSA	Junho	DQ381479
8736	2	HMJ	Junho	DQ381504
9475	8	HMSN	Setembro	DQ381506
10016	2	HMJ	Outubro	DQ381500

HMSA: Hospital Municipal Souza Aguiar; HMSN: Hospital Municipal Salles Neto; HMJ: Hospital Municipal Jesus.

A caracterização molecular dos NV foi realizada em 28 amostras selecionadas de acordo com a distribuição mensal das amostras obtidas pela detecção por RT-PCR. Protótipos disponíveis no “GenBank” foram utilizados para análise filogenética destas amostras que caracterizou 27 amostras pertencentes ao GII e uma pertencente ao GI/GG 2 (Southampton). No GII, observou-se a formação de três clusters distintos (a, b, c), embora não tenha sido possível identificar o GG destas amostras (Figura 5.9).

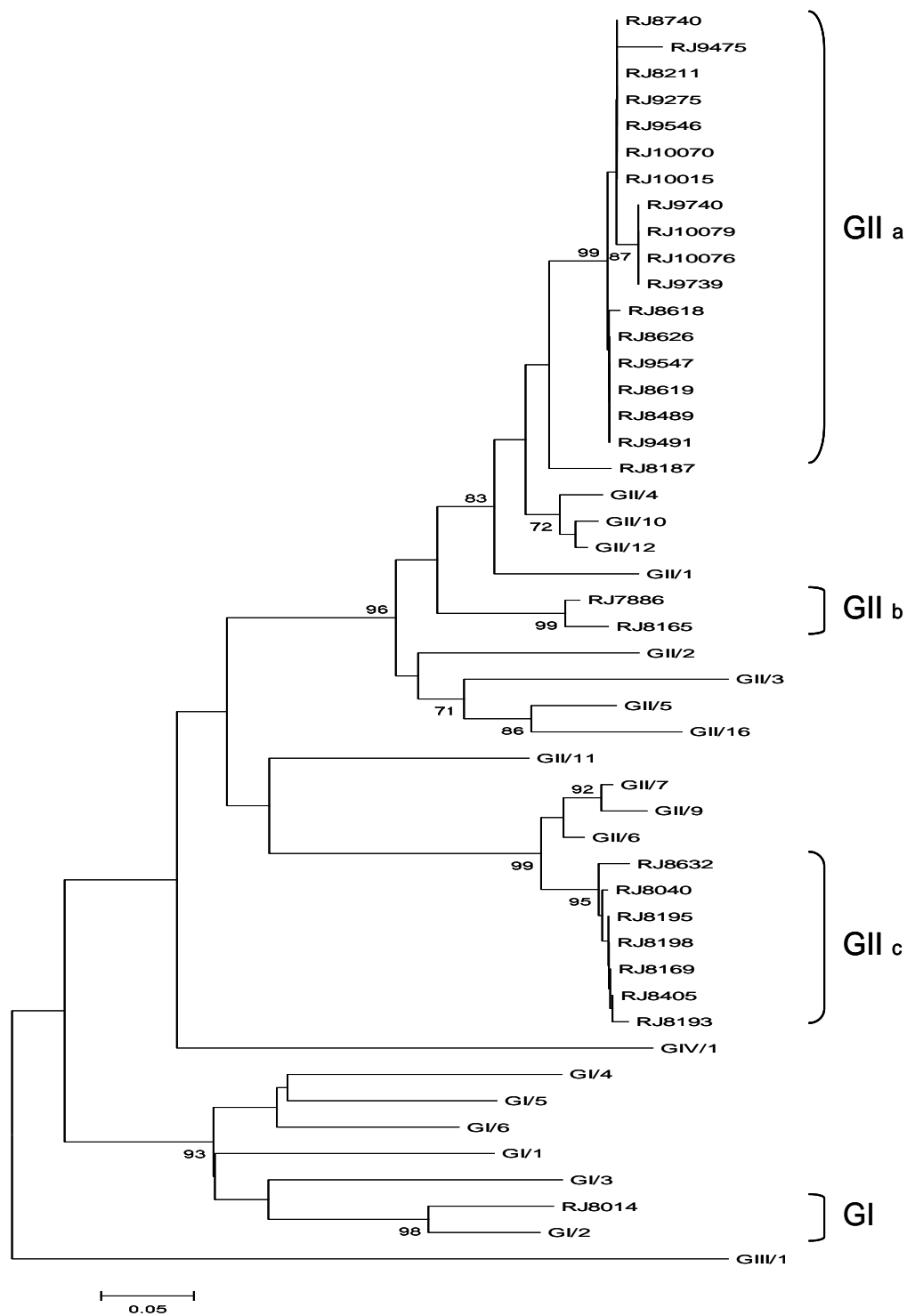


Figura 5.9 Árvore filogenética obtida a partir da análise de 172 nucleotídeos (nt 5114 - 5285) da região do genoma que codifica para a polimerase do norovírus (NV) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro. Os protótipos estão indicados pelo Genogrupo e o grupo genético (Exemplo G II/6). As amostras seqüenciadas neste trabalho estão representadas como RJ seguido pelo número de registro do Laboratório de Virologia Comparada (Exemplo: RJ8014). G I. Genogrupo I. G II. Genogrupo II.

As amostras do cluster GIIa apresentaram um valor máximo de divergência de 15% e agruparam com os protótipos dos Grupos Genéticos GII/4, GII/10 e GII/12. As duas amostras pertencentes ao cluster GIIb apresentaram divergência de 9%, agrupando com os protótipos GII/2, GII/3, GII/5 e GII/16. No cluster GIIc a divergência atingiu o valor máximo de 8% e as amostras agruparam com os GII/6, GII/7 e GII/9. A amostra pertencente ao GI/2 teve uma identidade nucleotídica de 85% com o protótipo.

A tabela 5.7 apresenta o número de registro das amostras de acordo com o genogrupo, hospital de origem, mês de coleta e o número de acesso no “GenBank”.

Tabela 5.7 Amostras de norovírus (NV) utilizadas na análise filogenética de acordo com o genogrupo, hospital de origem, mês e número de acesso do “GenBank”.

Amostra	Genogrupo	Hospital	Mês	Número de acesso
7886	GII	HSN	janeiro	DQ397312
8014	GI	HMSA	fevereiro	DQ397305
8040	GII	HMJ	fevereiro	DQ397309
8165	GII	HMSN	março	DQ397331
8169	GII	HMSN	março	DQ397328
8187	GII	HMSA	abril	DQ397314
8193	GII	HMSN	março	DQ397329
8195	GII	HMSN	março	DQ397332
8198	GII	HMSN	abril	DQ397330
8211	GII	HMSA	abril	DQ397308
8405	GII	HMJ	abril	DQ397315
8489	GII	HMSN	maio	DQ397316
8618	GII	HMSN	maio	DQ397306
8619	GII	HMSN	maio	DQ397322
8626	GII	HMJ	junho	DQ397323
8632	GII	HMJ	junho	DQ397307
8740	GII	HMJ	junho	DQ397317
9275	GII	HMSA	agosto	DQ397325
9475	GII	HMSN	setembro	DQ397318
9491	GII	HMJ	setembro	DQ397326
9546	GII	HMSN	setembro	DQ397319
9547	GII	HMJ	setembro	DQ397327
9739	GII	HMSN	setembro	DQ397324
9740	GII	HMSN	setembro	DQ397309
10015	GII	HMJ	outubro	DQ397320
10070	GII	HMJ	novembro	DQ397321
10076	GII	HMSN	outubro	DQ397310
10079	GII	HMSN	outubro	DQ397311

HMSA: Hospital Municipal Souza Aguiar; HMSN: Hospital Municipal Salles Neto; HMJ: Hospital Municipal Jesus.

A tabela 5.8 apresenta os casos de co-infecção de acordo com os genótipos.

Tabela 5.8 Genotipagem dos casos de co-infecção em crianças com gastroenterite aguda hospitalizadas no município do Rio de Janeiro, 2004.

Agente Etiológico	Número de Amostras
HAstV-1/NV GII	2
HAstV-8/NV GII	1
HAstV-1/RV	12
HAstV-2/RV	1
HAstV-4/RV	1
HAstV-8/RV	2
HAstV-1/NV GII/RV	3
NV GI/RV	1
NV GII/RV	6

5.5 Epidemiologia Molecular

Com o objetivo de demonstrar a origem dos diferentes genótipos dos HAstV detectados neste estudo, foram realizadas análises filogenéticas utilizando seqüências de protótipos e amostras provenientes de diferentes países. Este tipo de análise não foi realizado para os NV, uma vez que não foi possível a caracterização dos GG dificultando a interpretação dos resultados.

A análise dos HAstV-1 demonstraram que estes apresentaram maior identidade nucleotídica (90,2 – 99,7%) com a amostra do estado de Mato Grosso do Sul/2003 (Figura

5.10). O valor máximo de divergência entre as amostras foi de 13%, apresentando uma identidade com o protótipo de até 84% (Tabela 5.9).

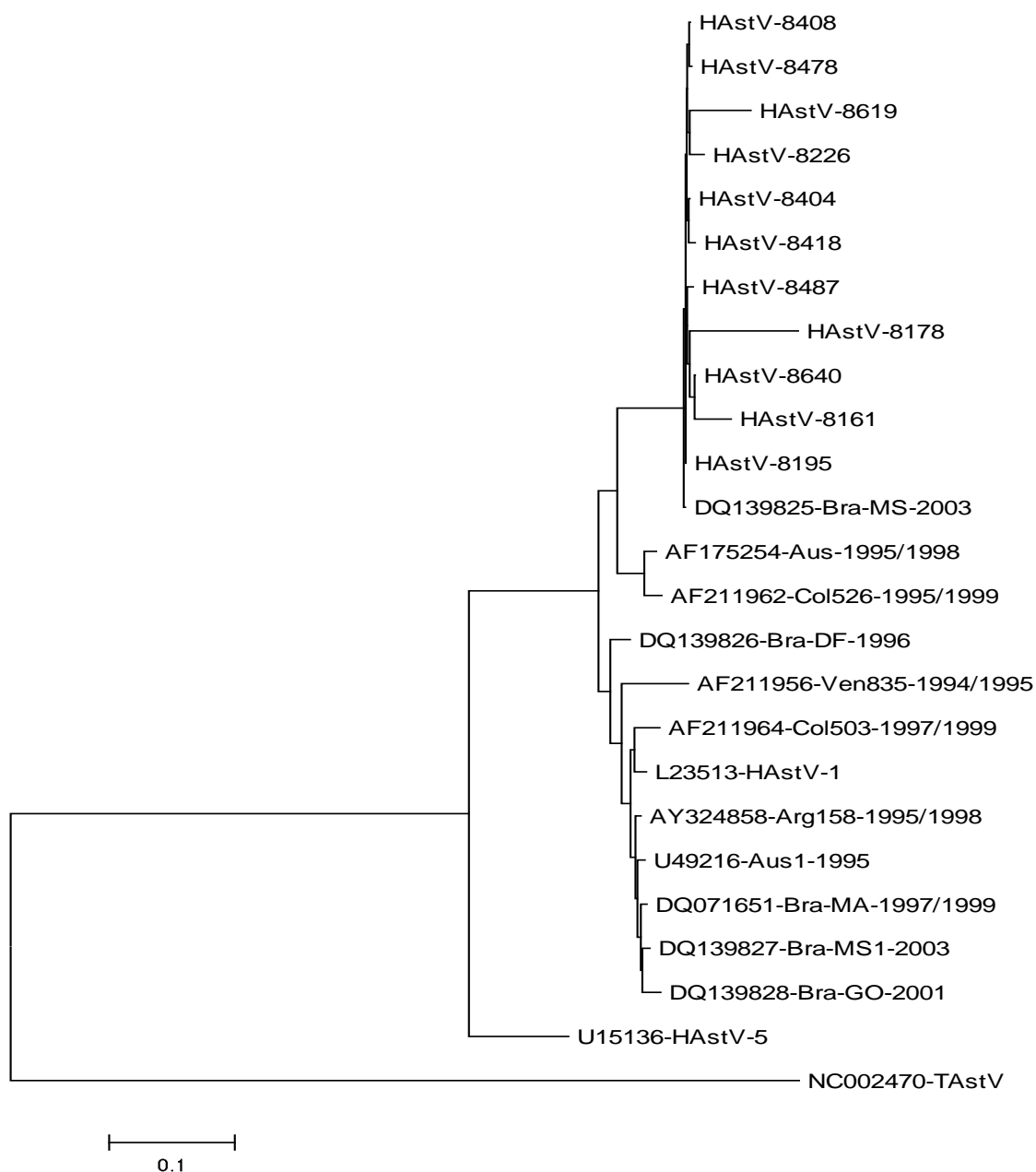


Figura 5.10 Árvore filogenética de amostras de astrovírus humano tipo 1 (HAstV-1) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro. As amostras estão indicadas pelo número de acesso do “GenBank” seguido das três primeiras letras do país e o ano de obtenção (Exemplo: AF175254-Aus-1995/1998). As amostras seqüenciadas neste trabalho estão representadas como HAstV seguido do número de registro (Exemplo: HAstV-8226). A unidade federativa está indicada nas amostras brasileiras (Exemplo: DQ071651-Bra-MA-1997/1999). Protótipo: L23513-HAstV-1.

Tabela 5.9 Matriz de identidade de 348 nucleotídeos (nt 4574 - 4921) da região do capsídeo de astrovírus humanos tipo 1 (HAstV-1) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.

	Bra-MS	Bra-MS1	Bra-DF	8408	8619	8195	8487	8640	8178	8161	8226	8404	8418	8478	HAstV-1
DQ139825-Bra-MS	-	0.902	0.910	0.994	0.948	0.997	0.991	0.988	0.913	0.959	0.982	0.994	0.988	0.991	0.896
DQ139827-Bra-MS1		-	0.965	0.896	0.856	0.899	0.893	0.893	0.833	0.864	0.885	0.896	0.890	0.893	0.971
DQ139826-Bra-DF			-	0.910	0.870	0.913	0.908	0.908	0.847	0.879	0.899	0.910	0.905	0.908	0.977
HAstV-8408				-	0.948	0.997	0.991	0.988	0.913	0.959	0.982	0.994	0.988	0.997	0.896
HAstV-8619					-	0.951	0.945	0.942	0.867	0.916	0.942	0.948	0.945	0.948	0.856
HAstV-8195						-	0.994	0.991	0.916	0.962	0.985	0.997	0.991	0.994	0.899
HAstV-8487							-	0.991	0.910	0.962	0.979	0.991	0.985	0.988	0.893
HAstV-8640								-	0.916	0.971	0.977	0.988	0.982	0.985	0.893
HAstV-8178									-	0.887	0.902	0.913	0.908	0.910	0.841
HAstV-8161										-	0.959	0.959	0.959	0.962	0.864
HAstV-8226											-	0.982	0.982	0.985	0.885
HAstV-8404												-	0.994	0.991	0.896
HAstV-8418													-	0.991	0.890
HAstV-8478														-	0.893
L23513HAstV-1															-

Os números em negrito localizados na parte superior direita da matriz representam a identidade das seqüências de nucleotídeos.

Esta mesma análise com os HAstV-2 demonstrou que estes foram similares com a amostra obtida em 1996 do Distrito Federal, apresentando identidade nucleotídica variando de 95,6% a 99,7% (Figura 5.11). Estas amostras apresentaram um valor máximo de divergência igual a 5% entre elas, e de 6% com o protótipo do tipo 2 (Tabela 5.10).

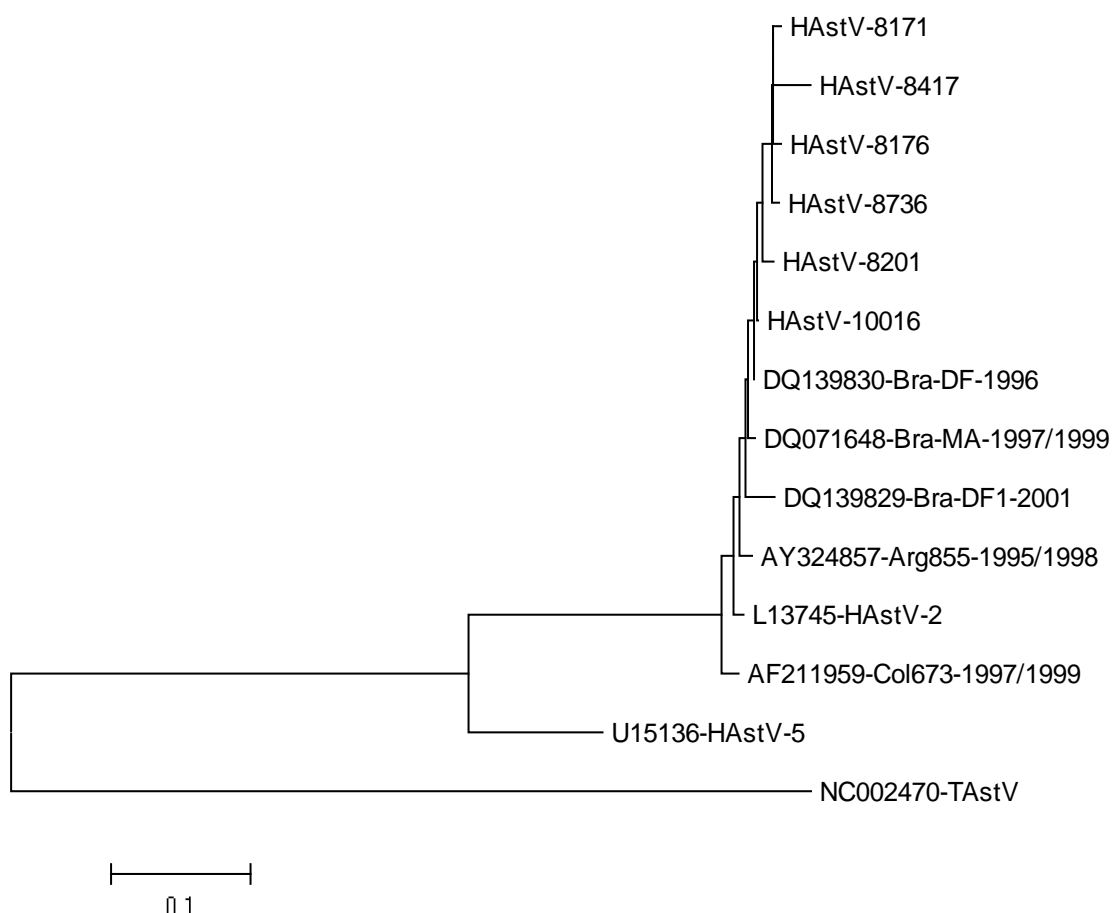


Figura 5.11 Árvore filogenética das amostras pertencentes ao astrovírus humano tipo 2 (HAstV-2) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro. As amostras estão indicadas pelo número de acesso do “GenBank” seguido das três primeiras letras do país e o ano de obtenção (Exemplo: AF211959-Col673-1997/1999). As amostras seqüenciadas neste trabalho estão representadas como HAstV seguido do número de registro (Exemplo: HAstV-8201). A unidade federativa está indicada nas amostras brasileiras (Exemplo: DQ071648-Bra-MA-1997/1999). Protótipo: L13745-HAstV-2.

Tabela 5.10 Matriz de identidade de 348 nucleotídeos (nt 4574 - 4921) da região do capsídeo de astrovírus humano tipo 2 (HAstV-2) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.

	Arg855	Col673	Bra-DF	Bra-DF1	Bra-MA	8176	10016	8171	8201	8417	8736	HAstV-2
AY324857-Arg855	-	0.971	0.982	0.962	0.979	0.956	0.979	0.956	0.959	0.939	0.962	0.979
AF211959-Col673		-	0.965	0.956	0.962	0.939	0.962	0.945	0.942	0.922	0.945	0.974
DQ139830-Bra-DF			-	0.974	0.991	0.974	0.997	0.974	0.977	0.956	0.979	0.979
DQ139829-Bra-DF1				-	0.974	0.948	0.971	0.948	0.951	0.931	0.959	0.965
DQ071648-Bra-MA					-	0.965	0.988	0.965	0.968	0.948	0.971	0.977
HAstV-8176						-	0.977	0.985	0.971	0.962	0.988	0.954
HAstV-10016							-	0.977	0.979	0.959	0.977	0.977
HAstV-8171								-	0.971	0.962	0.985	0.954
HAstV-8201									-	0.951	0.971	0.956
HAstV-8417										-	0.962	0.936
HAstV-8736											-	0.959
L13745-HAstV-2												-

Os números em negrito localizados na parte superior direita da matriz representam a identidade das seqüências de nucleotídeos.

A amostra do HAstV-4 agrupou com a da Venezuela de 1994/1995, apresentando uma identidade nucleotídica de 97,7% (Figura 5.12). A amostra apresentou uma identidade nucleotídica com o protótipo de 92% (Tabela 5.11).

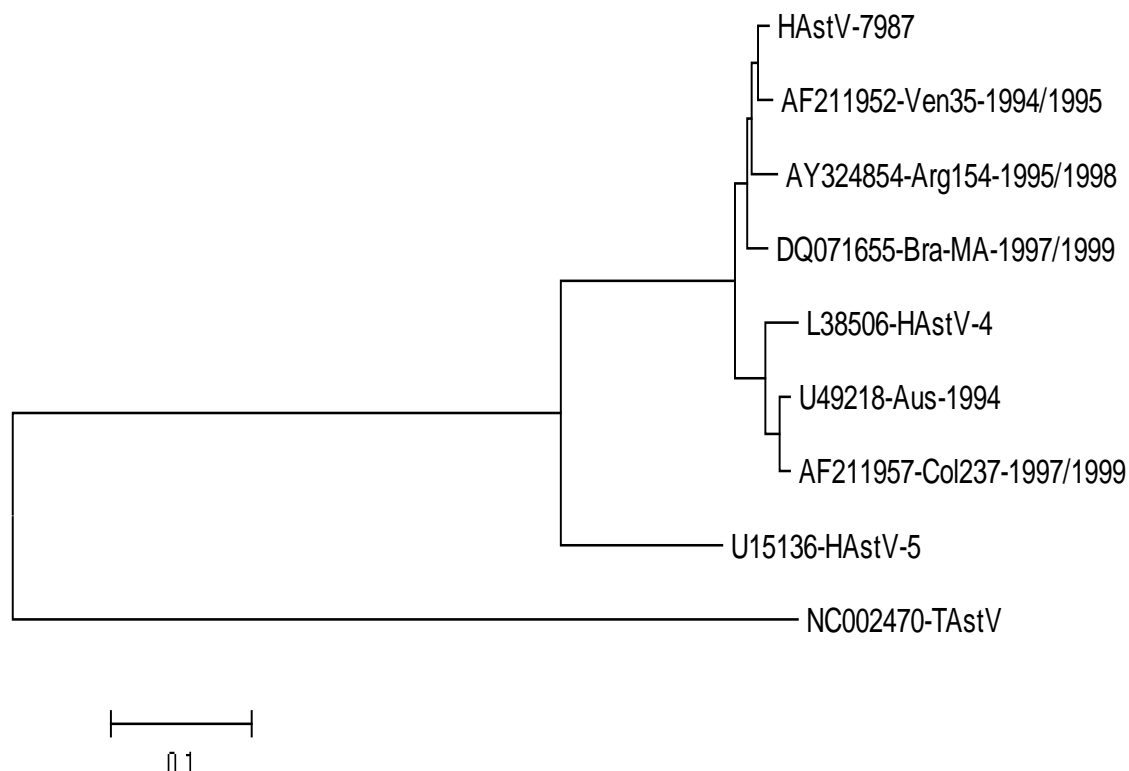


Figura 5.12 Árvore filogenética das amostras pertencentes ao astrovírus humano tipo 4 (HAstV-4) da amostra obtida no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro. As amostras estão indicadas pelo número de acesso do “GenBank” seguido das três primeiras letras do país e o ano de obtenção (Exemplo: AF211957-Col237-1997/1999). As amostras seqüenciadas neste trabalho estão representadas como HAstV seguido do número de registro (Exemplo: HAstV-7987). A unidade federativa está indicada nas amostras brasileiras (Exemplo: DQ071655-Bra-MA-1997/1999). Protótipo: L38506-HAstV-4.

Tabela 5.11 Matriz de identidade de 348 nucleotídeos (nt 4574 - 4921) da região do capsídeo de astrovírus humano tipo 4 (HAstV-4) da amostra obtida no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.

	Aus	Ven35	Arg154	Col237	Bra-MA	7987	HAstV-4
U49218-Aus	-	0.931	0.922	0.977	0.939	0.933	0.959
AF211952-Ven35		-	0.965	0.931	0.959	0.977	0.925
AY324854-Arg154			-	0.919	0.962	0.965	0.925
AF211957-Col237				-	0.939	0.931	0.954
DQ071655-Bra-MA					-	0.965	0.939
7987						-	0.922
L38506-HAstV-4							-

Os números em negrito localizados na parte superior direita da matriz representam a identidade das seqüências de nucleotídeos.

As amostras do HAstV-8 apresentaram grande variabilidade genética com valor de divergência de até 21% entre as amostras. A análise dos HAstV-8 demonstraram que estes apresentaram maior identidade nucleotídica com a amostra Espanha/1997 (82,7% a 99,7%) e com a amostra brasileira do estado de Goiás (82,4% a 99,1%). O maior valor de divergência com o protótipo foi de 22% (Figura 5.13 e Tabela 5.12).

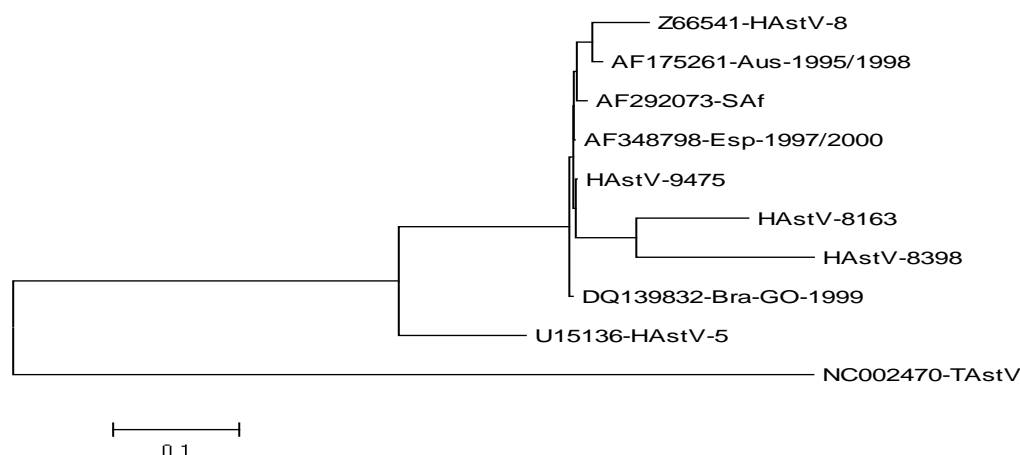


Figura 5.13 Árvore filogenética das amostras pertencentes ao astrovírus humano tipo 8 (HAstV-8) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro. As amostras estão indicadas pelo número de acesso do “GenBank” seguido das três primeiras letras do país e o ano de obtenção (Exemplo: AF348798-Esp-1997/2000). As amostras seqüenciadas neste trabalho estão representadas como HAstV seguido do número de registro (Exemplo: HAstV-8163). A unidade federativa está indicada nas amostras brasileiras (Exemplo: DQ139832-Bra-GO-1999). Protótipo: Z66541-HAstV-8.

Tabela 5.12 Matriz de identidade de 348 nucleotídeos (nt 4574 - 4921) da região do capsídeo de astrovírus humano tipo 8 (HAstV-8) de amostras obtidas no ano de 2004 no município do Rio de Janeiro.

	SAf	Bra-GO	Esp	Aus	HAstV-8	9475	8163	8398
AF292073-SAf	-	0.985	0.991	0.971	0.942	0.988	0.850	0.821
DQ139832-Bra-GO		-	0.994	0.974	0.933	0.991	0.856	0.824
AF348798-Esp			-	0.979	0.939	0.997	0.859	0.827
AF175261-Aus				-	0.951	0.977	0.847	0.824
Z66541-HAstV-8					-	0.936	0.816	0.781
9475						-	0.862	0.830
8163							-	0.790
8398								-

Os números em negrito localizados na parte superior direita da matriz representam a identidade das seqüências de nucleotídeos.

6 DISCUSSÃO

Estudos recentes têm demonstrado que após os RV, os HAstV e NV se alternam como os mais importantes agentes etiológicos da gastroenterite infantil aguda (Bereciartu et al, 2002; Cardoso et al, 2002, Espul et al, 2004; Hansman et al, 2004; Parashar et al, 2004; Gabbay et al 2005).

A ausência de um sistema sensível para replicação dos NV em cultura celular e a inexistência de modelo animal experimental retardou o desenvolvimento de métodos de diagnóstico deste vírus. A importância do NV como agente etiológico da gastroenterite aguda, tanto em casos esporádicos quanto em surtos, foi somente determinada após o desenvolvimento de métodos moleculares de detecção (Hutson et al, 2004). Até então, estudos epidemiológicos eram limitados a pequenas vigilâncias realizadas em laboratórios de centros de referência, utilizando a técnica de ME para a detecção viral. Em 1995, o estabelecimento da RT-PCR para detecção de NV, com sensibilidade de detecção de 10^2 partículas virais, representou um grande avanço para o diagnóstico destas infecções (Glass et al, 2000).

O protocolo de RT-PCR utilizado neste estudo tem sido descrito como adequado para triagem das infecções por NV, uma vez que utiliza quatro iniciadores que detectam simultaneamente os GI e GII. Estes iniciadores amplificam um fragmento da região conservada do gene que codifica a RpRd denominada região B (Parashar et al., 2004; Zheng et al, 2005). A taxa de detecção de 20% (65/318) obtida, utilizando este protocolo, foi similar àquela encontrada em estudos realizados na Holanda, Finlândia e Hong Kong (Pang et al, 2000; Rockx et al, 2002, Lau et al, 2004). Estudos realizados no EUA e no Japão, utilizando metodologias moleculares de detecção de NV, demonstraram 1% e 23%, respectivamente de ocorrência desta infecção (Okada et al, 2005).

No Brasil, o primeiro relato de ocorrência de NV (7%) em amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda foi relatado por Parks e colaboradores (1999). A diferença na taxa de detecção entre este relato e o presente estudo, pode estar relacionada à população estudada (crianças de comunidades carentes de Fortaleza, Ceará) ou à metodologia utilizada. Parks e colaboradores utilizaram para a extração do genoma viral um protocolo baseado na adição de brometo de cetiltrimetilamonio após precipitação com polietileno-glicol. Este método tem um desempenho limitado na eliminação de inibidores da reação da RT-PCR, quando comparado ao protocolo de extração com isotiocianato de guanidina/sílica utilizado neste estudo (Atmar & Estes, 2001). A grande variabilidade nas seqüências nucleotídicas dos NV e a inexistência

de iniciadores com capacidade de detecção universal destes vírus resultam em diferenças nas taxas de detecção de um grupo de amostras que circulam em uma determinada região (Zintz et al, 2005).

A RT-PCR tem sido a metodologia de eleição para a detecção de HAstV na maioria dos estudos epidemiológicos (Espul et al, 2004, Gabbay e al, 2005; Guix et al, 2005a). Alguns autores têm utilizado iniciadores dirigidos à região genômica conservada que codifica para as proteínas não-estruturais, enquanto outros utilizam iniciadores desenhados na região codificante das proteínas do capsídeo, que permitem a genotipagem dos HAstV. Neste estudo utilizou-se um protocolo de detecção empregando iniciadores desenhados na região 5' da ORF2. Este protocolo permite a detecção dos oitos sorotipos dos HAstV e, posterior genotipagem pelo seqüenciamento dos amplicons obtidos (Noel et al, 1995).

A ocorrência de 14% de HAstV observada encontra-se dentro da faixa de detecção que varia de 2% (Malawi) a 16% (Chile) (Gaggero et al, 1998; Cunliffe et al, 2002). No Brasil, Leite e colaboradores (1991) utilizando a ME para a detecção dos HAstV detectaram uma ocorrência de 4,2% no Rio de Janeiro. Esta baixa ocorrência pode estar relacionada à sensibilidade do método utilizado (Dalton et al, 2002). Em São Paulo, Stewien e colaboradores (1991) utilizando EIE detectaram HAstV em 3% dos casos de gastroenterite aguda em crianças hospitalizadas. A sensibilidade do EIE é similar à ME, porém inferior à RT-PCR. Estudos utilizando EIE têm relatado ocorrências de HAstV de 4% em crianças com diarreia em creches, 7,3% em crianças em ambulatórios e de 2,3% a 8,6% em crianças hospitalizadas (Herrmann et al, 1991; Lew et al, 1991; Cruz et al, 1992). Em Goiânia, Cardoso e colaboradores (2002) utilizando a RT-PCR obtiveram uma taxa de detecção de 2,8% em crianças de comunidades carentes.

Os elevados percentuais de detecção de HAstV (13,5%) e NV (20,4%) podem estar relacionados à metodologia empregada neste estudo e ao fato das crianças estarem hospitalizadas. A utilização de protocolos reconhecidos como de grande sensibilidade para detecção destes vírus, assim como o emprego de iniciadores randômicos (pdN6) para a síntese do cDNA, foram críticos para a obtenção destes resultados. Pang e colaboradores (2005) relataram que a utilização de iniciadores randômicos aumenta a sensibilidade da RT-PCR em pelo menos 100 vezes, quando comparada com a utilização de iniciadores específicos.

Originalmente, este estudo foi desenhado para avaliar a ocorrência de RV em crianças internadas em hospitais da rede municipal do Rio de Janeiro no ano de 2004. Desta forma, todas as amostras analisadas foram previamente investigadas para a presença destes vírus

(Costa, 2004). Os resultados obtidos demonstram a importância dos RV (33,3%), NV (20,4%) e HAstV (13,5%) nos quadros de gastroenterite infantil aguda que exigem hospitalização. O AdV entérico foi responsável por apenas um caso de gastroenterite (dado não demonstrado). A detecção de HAstV e/ou NV em 34% (108/318) dos casos estudados demonstra que estes vírus são responsáveis por 1/3 das hospitalizações pediátricas por gastroenterite. A ocorrência observada revela o NV como o segundo vírus enteropatogênico causador de gastroenterite infantil aguda, confirmando dados recentes da literatura (Pang et al 2000; Bereciartu et al, 2002).

A ocorrência de co-infecções entre vírus entéricos, como as observadas neste estudo, tem sido descrita com frequência nas investigações das gastroenterites (Chikhi-Brachet, 2002; Dalton et al, 2002; Gabbay et al, 2005; Galdiero et al, 2005; Liu et al, 2006). A co-infecção RV-HAstV foi a mais frequentemente detectada, representando 53,3% (16/30) dos casos de co-infecção. Este dado está de acordo com a literatura que descreve esta co-infecção como sendo a mais comum, provavelmente devido ao aumento da circulação destes vírus durante as estações de outono e inverno (Mendez-Toss et al, 2004; Miranda, 2004; Galdiero et al, 2005). Entretanto, casos de tripla infecção por RV, NV e HAstV, como os detectados neste trabalho, são raros. Na China, Liu et al (2006) detectaram esta tripla infecção quando investigavam casos de gastroenterite em pacientes atendidos em ambulatórios. Casos de tripla infecção, envolvendo diferentes genótipos de um mesmo vírus, têm sido relatados (Simpson et al, 2003; Phan et al, 2004; Gabbay et al, 2005) e as altas taxas observadas têm sido associadas com as precárias condições sanitárias (Phan et al 2004; Gabbay et al, 2005).

O pequeno número de casos de co-infecção não permitiu a realização de um estudo estatístico para aceitar ou refutar os dados da literatura que indicam que as co-infecções não influenciam o quadro clínico no desenvolvimento de uma doença mais grave (Gaggero et al, 1998).

A investigação de RV é considerada a primeira opção de diagnóstico nos casos de gastroenterite infantil aguda, de forma que a detecção deste vírus interrompe o fluxo de diagnóstico para outros agentes, subestimando o número de casos de co-infecção. Métodos de diagnóstico que detectam simultaneamente diferentes vírus entéricos (Multiplex PCR) possibilitam a detecção de co-infecções embora, geralmente, apresentem menor sensibilidade de detecção (Beuret, 2004; Rohayem et al, 2004).

Recentemente, Rodriguez-Guillen e colaboradores (2005) sugeriram que os NV são importantes patógenos oportunistas em crianças HIV soropositivas. Neste trabalho, três casos

de co-infecção de NV-HIV foram detectados, não sendo possível realizar uma análise estatística para se determinar a importância desta co-infecção (dados não demonstrados). Embora os HAstV também tenham sido descritos como agentes oportunistas em indivíduos imunossuprimidos (Cunliffe et al, 2002), casos de co-infecção HAstV-HIV não foram observados neste estudo.

Infecções por NV e HAstV foram detectadas em todos os grupos etários analisados, entretanto observou-se um padrão diferenciado por gênero e grupo etário na distribuição da frequência destas infecções.

As infecções por NV foram observadas, principalmente, nos grupos etários de 0 a 6 e de 7 a 12 meses, demonstrando que 49% destas infecções ocorrem em crianças menores de um ano. Este resultado está de acordo com dados de um estudo realizado com crianças hospitalizadas no Paquistão (Phan et al, 2004). A queda da taxa de detecção após um ano de idade pode estar relacionada ao desenvolvimento de imunidade protetora (Parks et al, 1999). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os sexos e os grupos etários, confirmando dados descritos na literatura (Lau et al, 2004; Fretz et al, 2005).

As infecções por HAstV foram detectadas principalmente (37%) em crianças de 0 a 6 meses de idade, com maior ocorrência no sexo feminino. No grupo etário de 7 a 12 meses foi observado 21% de positividade, sendo a maior número de casos no sexo masculino. Relatos demonstram que as infecções causadas por HAstV acometem principalmente crianças menores de um ano de idade (Naficy et al, 2000; Cunliffe et al, 2002; Espul et al, 2004; Liu et al, 2004). Entretanto, outros estudos realizados com crianças menores de cinco anos, observaram picos de detecção nos grupos de 0 a 6 meses e de 2 a 3 anos de idade (Guix et al, 2002; Giordano et al, 2004). Na literatura não têm sido descritas diferenças na taxa de detecção de HAstV com relação ao gênero. Entretanto, diferenças significativas entre os sexos têm sido relatadas em casos de gastroenterite (Qiao et al, 1999; Marie-Cardine et al, 2002; Giordano et al 2004).

No Brasil, poucos estudos correlacionam infecções por HAstV com o grupo etário. Em Goiânia, Cardoso e colaboradores (2002) observaram que estas infecções ocorrem principalmente em crianças de 1 a 2 anos de idade, enquanto Gabbay e colaboradores (2005) detectaram, em São Luís (Maranhão), maior frequência de infecções em crianças no grupo etário de 0 a 6 meses, como observado neste estudo. A importante queda na detecção do HAstV em crianças maiores de dois anos de idade pode estar relacionada ao desenvolvimento da imunidade ativa, conferindo proteção contra a infecção (Giordano et al, 2004).

O padrão de sazonalidade das infecções por NV e HAstV ainda não está completamente estabelecido (Walter & Mitchell, 2003). Neste estudo, a maioria das infecções por NV ocorreu no outono e na primavera, quando foram observadas quedas importantes no índice pluviométrico. Estes resultados corroboram dados obtidos em um estudo realizado no Vietnã que associou a maior ocorrência de NV aos meses secos do ano (Hansman et al, 2004). Embora alguns estudos demonstrem maior ocorrência de NV no inverno (Bereciartu et al, 2002; Phan et al, 2004; Bon et al, 2005; Fretz et al, 2005), outros descrevem um aumento importante na frequência destas infecções nos meses da primavera e do verão (Marshall et al, 2003; Parashar et al, 2004). Estudos realizados nos EUA e no Chile não estabeleceram um padrão de sazonalidade para estes vírus (O’Ryan et al, 2000; Zintz et al, 2005).

Neste estudo, as infecções por HAstV foram observadas principalmente no outono, quando foram registradas quedas na temperatura média e no índice pluviométrico, corroborando dados observados por Miranda (2004), também no Rio de Janeiro. O aumento da umidade relativa observada no presente trabalho (dados não demonstrados) está de acordo com dados do estudo realizado em Brasília e Goiânia (Santos, 2005).

Estudos realizados na Argentina, Espanha, Austrália e Itália, países de clima temperado, revelaram maiores frequências de detecção de HAstV no final de outono e inverno (Mustafa et al, 2000; Guix et al, 2002; Giordano et al, 2004; Galdiero et al, 2005). Entretanto, estudos realizados no Egito e no Paquistão apontam os meses da primavera e do verão como os períodos sazonais das infecções (Naficy et al, 2000; Phan et al, 2004). No Brasil, estudo realizado em Goiânia (GO) demonstrou sazonalidade de HAstV na primavera e no início do verão, correspondendo à estação chuvosa (Cardoso et al, 2002), enquanto que em São Luís (Maranhão), Gabbay e colaboradores (2005) não observaram nenhum padrão de sazonalidade durante os dois anos de estudo.

Os resultados referentes à sazonalidade de NV e HAstV devem ser analisados com cautela, uma vez que este estudo foi realizado por um período de um ano. Investigações abrangendo longos períodos (dois ou mais anos) demonstram que o padrão de sazonalidade destes vírus pode variar ou simplesmente não existir (Mustafá et al, 2000; Cardoso et al, 2002).

As manifestações clínicas frequentemente associadas às infecções por NV além da diarreia e desidratação foram tosse (51%) e vômito (33%), sendo a febre observada em 22% dos casos. Embora o vômito seja descrito como uma importante manifestação clínica observada nas infecções por NV em crianças (Moreno-Espinosa et al, 2004), este dado não foi

confirmado no presente estudo. Rockx e colaboradores (2002) detectaram percentuais para vômito (74%) e febre (32%) superiores aos detectados no presente trabalho. Em relação à tosse, não existem relatos na literatura avaliando este sinal em casos de gastroenterite por NV. Estes dados apontam para a necessidade de investigações que, eventualmente, estabeleçam associações de NV com outros agentes etiológicos de infecções respiratórias.

Em relação às infecções por HAstV, as manifestações clínicas mais freqüentes além da diarreia e desidratação foram vômito (48%) e febre (38%), corroborando achados previamente descritos (Dalton et al, 2002; Guix et al, 2002; Giordano et al, 2004). Por outro lado, Gabbay e colaboradores (2005), em estudo realizado em São Luís (Maranhão), detectaram 89% de vômito e febre nos casos de infecção por HAstV.

O sequenciamento parcial do genoma tem sido amplamente utilizado tanto na identificação de genótipos virais como em estudos de epidemiologia molecular que se baseiam na variabilidade genética dos mesmos (Noel et al 1995; Espul et al 2004; Guix et al, 2005a; Okada et al 2005).

A caracterização molecular dos HAstV identificou o HAstV-1 como prevalente, representando 71% do total das amostras seqüenciadas, corroborando dados previamente encontrados em diversos países, incluindo o Brasil, que descrevem o HAstV -1 como o mais prevalente no mundo (Espul et al, 2004; Mendez-Toss et al, 2004; Gabbay et al, 2005; Galdiero et al, 2005; Silva, 2006). A divergência de 11,3% observada entre as amostras do HAstV-1 circulantes no Rio de Janeiro foi similar àquela descrita por Guix e colaboradores (2002) na Espanha. Adicionalmente, a taxa de divergência observada entre as amostras e o protótipo sugere uma variabilidade genética nessa região do genoma que é observada pelo agrupamento de amostras circulantes de uma mesma região geográfica, em diferentes linhagens dentro do mesmo genótipo. Estes dados são consistentes com os observados nos trabalhos realizados na Colômbia (Medina et al, 2000) e no Brasil (Gabbay et al, 2005).

As amostras de HAstV-1 circulantes no Rio de Janeiro (2004) foram similares a uma do Mato Grosso do Sul e agrupadas próximas a amostras provenientes da Colômbia e Austrália. É interessante notar que no ano de 2003 circulavam duas amostras distintas no estado do Mato Grosso do Sul, sendo a outra similar às amostras circulantes em Goiás (2001) e no Maranhão (1997-99), sugerindo que a variabilidade observada nesta região do genoma resulta na co-circulação de diferentes linhagens do HAstV-1 no Brasil.

No presente estudo, o segundo genótipo mais prevalente foi o HAstV-2 (17%). Este genótipo, assim como o HAstV-4, têm sido descrito como o segundo mais prevalente,

dependendo do país ou região (Gaggero et al, 1998; Dalton et al, 2002; Jakab et al, 2004; Silva, 2006). Neste estudo, as amostras de HAstV-2 apresentaram uma divergência máxima de 5%, similar àquela observada entre estas amostras e o protótipo (6%). A divergência das amostras de HAstV-2 com o protótipo foi inferior à detectada na maioria dos trabalhos onde a mesma é de cerca de 14% (Mustafá et al, 2000; Guix et al, 2002; Schnagl et al, 2002). Taxas de divergência de 2% (Argentina) e de 14% (Austrália) foram observadas entre amostras de uma mesma região geográfica (Schnagl et al, 2002; Espul et al, 2004). A similaridade entre as amostras de HAstV-2 genotipadas neste estudo com aquelas provenientes de outros estados brasileiros sugere a circulação de uma única linhagem deste genótipo no país, similar àquela circulante na Argentina.

A única amostra de HAstV-4 detectada neste estudo apresentou uma identidade nucleotídica de 92% com o protótipo, percentual similar àquele observado em outros países (Mustafá et al 2000; Schnagl et al, 2002; Espul et al, 2004). A análise filogenética demonstrou similaridade nucleotídica desta amostra com outra proveniente da Venezuela, sugerindo uma linhagem comum destas amostras.

A detecção de três amostras de HAstV-8 (8,6%) do total de amostras genotipadas, sugere maior circulação deste genótipo (Naficy et al, 2000; Mustafa et al, 2000; Espul et al, 2004; Mendez-Toss et al, 2004; Silva, 2006), uma vez que o HAstV-8 tem sido descrito como um genótipo raro (Mustafá et al, 2000). A análise da variabilidade genética entre os HAstV-8 foi dificultada pela indisponibilidade de dados na literatura. Entretanto, pôde-se observar que as três amostras detectadas mostraram-se filogeneticamente mais relacionadas com a amostra circulante na Espanha do que com aquela detectada em Goiânia.

A circulação de quatro ou mais genótipos de HAstV em uma determinada região geográfica, como observada neste estudo, é comum, tendo sido relatada em países, tais como México, Argentina, Austrália e Brasil (Mustafá et al, 2000; Espul et al, 2004; Mendez-Toss et al, 2004; Gabbay et al, 2005; Silva, 2006). A análise filogenética destas amostras destaca a variabilidade intragenotípica, especialmente para o HAstV-1. Esta variabilidade genética pode, eventualmente, ser traduzida em aminoácidos originando determinantes antigênicos que poderiam prover vantagens evolutivas ao vírus.

O seqüenciamento parcial do genoma (RpRd) dos NV caracterizou 27 amostras como pertencentes ao GII e uma ao GI, corroborando estudos da literatura que descrevem a alta ocorrência e a ampla distribuição geográfica deste genogrupo (Bon et al, 2005; Okada et al, 2005; Zintz et al, 2005). Entretanto, esta metodologia não permitiu a caracterização em GG

das amostras pertencentes ao GII. Fankhauser e colaboradores (2002) utilizando esta mesma região também não obtiveram sucesso na classificação dos GG. Estes resultados demonstraram que esta região do genoma, adequada para a detecção viral, não é satisfatória para a classificação dos GG do GII, embora permita a classificação dos GG do GI.

Recentemente, Zheng e colaboradores (2005) propuseram uma classificação com critérios definidos para genogrupos, grupos genéticos e cepas a partir da análise filogenética dos aminoácidos que constituem a proteína do capsídeo viral. Estes mesmos autores descrevem que fragmentos menores do genoma podem ser utilizados em estudos de caracterização molecular de larga escala (Zheng et al, 2005).

Este é o primeiro estudo epidemiológico realizado no município do Rio de Janeiro determinando a ocorrência e a diversidade genética dos NV e dos HAstV em casos de gastroenterite aguda em crianças hospitalizadas. O percentual dos casos resultante de infecções por HAstV e NV, assim como a variabilidade das amostras circulantes apontam a necessidade da implantação de métodos sensíveis de diagnóstico para estes vírus, cujas infecções têm sido subestimadas.

As infecções por NV, em geral, estão associadas a surtos decorrentes da ingestão de alimentos e águas contaminados, não sendo comumente considerados em casos esporádicos de gastroenterite, particularmente em crianças hospitalizadas.

Este trabalho contribuiu principalmente para alertar para o alto número de infecções por NV e HAstV que resultam em hospitalizações, revelando estes vírus como importantes agentes da gastroenterite infantil aguda.

7 CONCLUSÕES

- NV e HAstV foram detectados em 20,4% e 13,5% dos casos de gastroenterite aguda em crianças hospitalizadas no município do Rio de Janeiro, demonstrando a importância destes vírus em casos graves de gastroenterite infantil aguda.
- O percentual de co-infecção (9,4%), principalmente no grupo etário de 0 a 6 meses, reflete a ampla distribuição dos HAstV e NV.
- As infecções por HAstV e NV foram detectadas em todos os grupos etários estudados, com cerca de 80% destas ocorrendo em crianças de até 24 meses, sendo que o maior número de casos foi observado em crianças pertencentes ao grupo etário de 0-6 e 7-12 meses de idade, respectivamente.
- A maior ocorrência de infecções por NV foi observada no período de março a maio, e nos meses de setembro e outubro, correspondendo às estações de outono e primavera. No ano de 2004 este período foi correlacionado com quedas importantes no índice pluviométrico associando a ocorrência dos NV aos períodos secos.
- Os HAstV apresentaram maior positividade no período de março a maio correspondendo a estação do outono, coincidindo com quedas de temperatura e do índice pluviométrico.
- Febre, vômito e tosse foram as principais manifestações clínicas observadas acompanhando os quadros de gastroenterite aguda, uma vez que diarreia e desidratação foram consideradas critérios de inclusão. Embora tosse não seja uma manifestação usualmente avaliada nos casos de gastroenterite, o alto percentual (51%) desta manifestação nos casos de NV aponta a necessidade de investigações com o objetivo de associar estas infecções com agentes etiológicos de infecções respiratórias.

- A caracterização molecular dos HAstV demonstrou a circulação simultânea de quatro genótipos no ano de 2004, sendo o HAstV-1 (71,4%) o mais freqüente, seguido pelos HAstV-2 (17,1%), HAstV-8 (8,6%) e HAstV-4 (2,9%). A análise filogenética das amostras demonstrou variabilidade intragenotípica, especialmente para o HAstV-8.

- A caracterização molecular dos NV demonstrou a circulação dos GI e GII. O alto percentual (96%) das amostras pertencentes ao GII confirma a distribuição global deste genogrupo.

- A análise filogenética baseada na região do genoma que codifica a RpRd dos NV foi eficiente na caracterização dos genogrupos, porém não permitiu a classificação em GG dos vírus pertencentes ao GII.

- Os 27 NV detectados foram agrupados em três clusters genéticos, confirmando a grande variabilidade genética destes vírus.

8 PERSPECTIVAS

Realizar sequenciamento parcial dos vírus pertencentes ao GII com o objetivo de identificar o GG destas amostras. Serão utilizados iniciadores para amplificação e sequenciamento de um fragmento da região do genoma que codifica para a proteína do capsídeo, denominada região D, localizada na extremidade 3' da ORF2. Recentemente, esta região foi descrita como adequada para a caracterização dos GG (Zheng et al, 2005).

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ^a

Al-Mutairy B, Walter JE, Pothen A, Mitchell DK. Genome Prediction of Putative Genome-Linked Viral Protein (VPg) of Astroviruses. **Virus Genes**. 2005; 31(1): 21-30.

Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses. **J Infect Dis**. 2000; 181(Sup 2): S336-48.

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

Asanaka M, Atmar RL, Ruvolo V, Crawford SE, Neill FH, Estes MK. Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2005; 102(29): 10327-32.

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. **Clin Microbiol Rev**. 2001; 14(1): 15-37.

Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. **J Hosp Infect**. 2004; 58(1): 42-9.

Bass DM, Qiu S. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. **J Virol**. 2000; 74(4): 1810-4.

Bass DM, Upadhyayula U. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. **J Virol**. 1997; 71(11): 8666-71.

Basu G, Rossouw J, Sebunya TK, Gashe BA, de Beer M, Dewar JB, Steele AD. Prevalence of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection in young children with gastroenteritis in Gaborone, Botswana. **East Afr Med J**. 2003; 80(12): 652-5.

Behling-Kelly E, Schultz-Cherry S, Koci M, Kelley L, Larsen D, Brown C. Localization of astrovirus in experimentally infected turkeys as determined by in situ hybridization. **Vet Pathol**. 2002; 39(5): 595-8.

Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. **J Med Virol.** 1997; 51(2): 101-6.

Belliot G, Sosnovtsev SV, Chang KO, Babu V, Uche U, Arnold JJ, Cameron CE, Green KY. Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of RNA-dependent RNA polymerase. **J Virol.** 2005; 79(4): 2393-403.

Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, Hammer C, Garfield M, Green KY. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. **J Virol.** 2003; 77(20): 10957-74.

Bereciartu A, Bok K, Gomez J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. **J Clin Virol.** 2002; 25(2): 197-203.

Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. **J Virol.** 2003; 77(21): 11603-15.

Beuret C. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. **J Virol Methods.** 2004; 115(1): 1-8.

Blakeney SJ, Cahill A, Reilly PA. Processing of Norwalk virus nonstructural proteins by a 3C-like cysteine proteinase. **Virology.** 2003; 308(2): 216-24.

Bon F, Ambert-Balay K, Giraudon H, Kaplon J, Le Guyader S, Pommepuy M, 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.** 2005; 43(9): 4659-64.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol.** 1990; 28(3): 495-503.

Brugha R, Vipond IB, Evans MR, Sandifer QD, Roberts RJ, Salmon RL. A community outbreak of food-borne small round-structured virus gastroenteritis caused by a contaminated water supply. **Epidemiology and Infection**. 1999; 122: 145–154.

Cardoso D, Fiaccadori FS, Borges de Lima Dias e Souza M, Bringel Martins RM, Gagliardi Leite JP. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiania, Goias, Brazil. **Med Sci Monit**. 2002; 8(9): CR624-8.

Castello AA, Arvay ML, Glass RI, Gentsch J. Rotavirus strain surveillance in Latin America: a review of the last nine years. **Pediatr Infect Dis J**. 2004; 23(10 Suppl): S168-72.

Caul EO. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part II. The epidemiological perspective. **J Clin Pathol**. 1996; 49(12): 959-64.

CDC. Stool Cup to Sequence. A training manual for the detection of noroviruses in stool samples. Centers for Disease Control and Prevention (eds.). Atlanta, EUA, p. 113, 2004.

Chikhi-Brachet R, Bon F, Toubiana L, Pothier P, Nicolas JC, Flahault A, Kohli E. Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. **J Clin Microbiol**. 2002; 40(11): 4266-72.

Costa FAC. **Diarréia aguda por rotavírus com desidratação grave: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais em dois hospitais públicos do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro; 2004. Mestrado [Pós-Graduação em Medicina Tropical] – Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz.

Cruz JR, Bartlett AV, Herrmann JE, Caceres P, Blacklow NR, Cano F. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. **J Clin Microbiol**. 1992; 30: 11404.

Cunliffe NA, Dove W, Gondwe JS, Thindwa BD, Greensill J, Holmes JL, Bresee JS, Monroe SS, Glass RI, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. Detection and characterisation of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. **J Med Virol**. 2002; 67(4): 563-6.

Dalton RM, Roman ER, Negredo AA, Wilhelmi ID, Glass RI, Sanchez-Fauquier A. Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. **Pediatr Infect Dis J.** 2002; 21(11): 1038-41.

Dedman D, Laurichesse H, Caul EO, Wall PG. Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales, 1990-5. **Epidemiol Infect.** 1998; 121(1): 139-49.

Dennehy PH, Nelson SM, Spangenberg S, Noel JS, Monroe SS, Glass RI. A prospective case-control study of the role of astrovirus in acute diarrhea among hospitalized young children. **J Infect Dis.** 2001; 184(1): 10-5.

Diskin A. **Gastroenteritis.** [online]. Nebraska, EUA; 2004. [capturado 9 ago. 2004]. Disponível em: <http://www.emedicine.com/emerg/topic213.htm>.

Donelli G, Superti F, Tinari A, Marziano ML. Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells. **J Med Virol.** 1992; 38(4): 271-7.

Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of caliciviruses. **Appl Environ Microbiol.** 2004; 70(8): 4538-43.

Espul C, Martinez N, Noel JS, Cuello H, Abrile C, Grucci S, Glass R, Berke T, Matson DO. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. **J Med Virol.** 2004; 72(1): 75-82.

Estes MK, Ball JM, Guerrero RA, Opekun AR, Gilger MA, Pacheco SS. Norwalk virus vaccines: Challenges and progress. **J Infect Dis.** 2000; 181(Suppl 2): S367-S373.

Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD. Epidemiological and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. **J Infect Dis.** 2002; 186: 1-7.

Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. **J Infect Dis.** 1998; 178: 1571-1578.

Foley B, O'Mahony J, Morgan SM, Hill C, Morgan JG. Detection of sporadic cases of Norwalk-like virus (NLV) and astrovirus infection in a single Irish hospital from 1996 to 1998. **J Clin Virol.** 2000; 17(2): 109-17.

Fretz R, Herrmann L, Christen A, Svoboda P, Dubuis O, Viollier EH, Tanner M, Baumgartner A. Frequency of Norovirus in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms in Switzerland. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2005; 24(3): 214-6.

Froggatt PC, Barry Vipond I, Ashley CR, Lambden PR, Clarke IN, Caul EO. 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.** 2004; 72(2): 307-11.

Gabbay YB, Luz CR, Costa IV, Cavalcante-Pepino EL, Sousa MS, Oliveira KK, Wanzeller AL, Mascarenhas JD, Leite JP, Linhares AC. Prevalence and genetic diversity of astroviruses in children with and without diarrhea in Sao Luis, Maranhao, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2005; 100(7): 709-14.

Gaggero A, O'Ryan M, Noel JS, Glass RI, Monroe SS, Mamani N, Prado V, Avendano LF. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. **J Clin Microbiol.** 1998; 36(12): 3691-3.

Galdiero E, Marinelli A, Pisciotta MG, Pagliara I, Di Monteforte ES, Liguori G. Reverse transcriptase-PCR for the detection of Astrovirus in children with nosocomial acute diarrhoea in Naples, Italy. **Med Mal Infect.** 2005; 35(4): 213-7.

Gallimore CI, Barreiros MA, Brown DW, Nascimento JP, Leite JP. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Med Biol Res.** 2004; 37(3): 321-6.

Geigenmuller U, Chew T, Ginzton N, Matsui SM. Processing of nonstructural protein 1a of human astrovirus. **J Virol.** 2002; 76(4): 2003-8.

Giordano MO, Martinez LC, Isa MB, Paez Rearte M, Nates SV. Childhood astrovirus-associated diarrhea in the ambulatory setting in a Public Hospital in Cordoba city, Argentina. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2004; 46(2): 93-6.

Glass RI, Noel J, Mitchell D. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. **Arch Virol**. 1996; 12: 287-300.

Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparc-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. **J Virol**. 2000; 74(14): 6581-91.

Glass PJ, Zeng CQ, Estes MK. Two nonoverlapping domains on the Norwalk virus open reading frame 3 (ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions. **J Virol**. 2003; 77(6): 3569-77.

Gray EW, Angus KW, Snodgrass DR. Ultrastructure of the small intestine in astrovirus-infected lambs. **J Gen Virol**. 1980; 49(1): 71-82.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel HJ. Taxonomy of the caliciviruses. **J Infect Dis**. 2000; 181(Suppl 2): S322-30.

Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. Human Caliciviruses. In: Knipe D. M., Howley P. M., Chanock R. M., Melnick J. L., Monath T. P., Roizman B., Straus S. E. (eds.). **Fields in Virology**. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 4th ed. vol 1, p. 875-893, 2001.

Greenberg HB, Valdesuso J, Yolken RH, Gangarosa E, Gary W, Wyatt RG, Konno T, Suzuki H, Chanock RM, Kapikian AZ. Role of Norwalk virus in outbreaks of nonbacterial gastroenteritis. **J Infect Dis**. 1979; 139(5): 564-8.

Guerrero ML, Noel JS, Mitchell DK, Calva JJ, Morrow AL, Martinez J, Rosales G, Velazquez FR, Monroe SS, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. **Pediatr Infect Dis J**. 1998; 17(8): 723-7.

Guix S, Bosch A, Pinto RM. Human astrovirus diagnosis and typing: current and future prospects. **Lett Appl Microbiol**. 2005a; 41(2): 103-5.

Guix S, Bosch A, Ribes E, Dora Martinez L, Pinto RM. Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells. **Virology**. 2004; 319(2): 249-61.

Guix S, Caballero S, Bosch A, Pinto RM. Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication. **Virology**. 2005; 333(1): 124-31.

Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolome R, Latorre C, Rabella N, et al. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. **J Clin Microbiol**. 2002; 40(1): 133-9.

Gunson RN, Miller J, Carman WF. Comparison of real-time PCR and EIA for the detection of outbreaks of acute gastroenteritis caused by norovirus. **Commun Dis Public Health**. 2003; 6(4): 297-9.

Gutierrez-Escolano AL, Vazquez-Ochoa M, Escobar-Herrera J, Hernandez-Acosta J. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. **Biochem Biophys Res Commun**. 2003; 311(3): 759-66.

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

Hansman GS, Doan LT, Knguyen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, et al. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. **Arch Virol**. 2004; 149(9): 1673-88.

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

Herrmann JE, Nowak NA, Blacklow NR. Detection of Norwalk virus in stools by enzyme immunoassay. **J Med Virol**. 1985; 17(2): 127-33.

Herrmann JE, Taylor DN, Echeverria P, Blacklow NR. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. **N Engl J Med.** 1991; 324: 1757-60.

Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. **Trends Microbiol.** 2004; 12(6): 279-87.

Jakab F, Meleg E, Banyai K, Melegh B, Timar L, Peterfai J, Szucs G. One-year survey of astrovirus infection in children with gastroenteritis in a large hospital in Hungary: occurrence and genetic analysis of astroviruses. **J Med Virol.** 2004; 74(1): 71-7.

Jiang B, Monroe SS, Koonin EV, Stine SE, Glass RI. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1993; 90(22): 10539-43.

Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. **Clin Microbiol.** 1992; 30(10): 2529-34.

Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. **Virology.** 1993a; 195(1): 51-61.

Jonassen CM, Jonassen T TO, Sveen TM, Grinde B. Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. **Virus Res.** 2003; 91(2): 195-201.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. **J Clin Microbiol.** 2003; 41(4): 1548-57.

Kapikian AZ. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. **J Infect Dis.** 2000; 181(Suppl 2): S295-302.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **J Virol.** 1972; 10(5): 1075-81.

Kobayashi S, Sakae K, Suzuki Y, Shinozaki K, Okada M, Ishiko H, Kamata K, Suzuki K, Natori K, Miyamura T, Takeda N. Molecular cloning, expression, and antigenicity of Seto virus belonging to genogroup I Norwalk-like viruses. **J Clin Microbiol.** 2000; 38(9): 3492-4.

Koci MD. Immunity and resistance to astrovirus infection. **Viral Immunol.** 2005; 18(1): 11-6.

Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ.** 2003; 81(3): 197-204.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics.** 2001; 17(12): 1244-5.

Lau CS, Wong DA, Tong LK, Lo JY, Ma AM, Cheng PK, Lim WW. High rate and changing molecular epidemiology pattern of norovirus infections in sporadic cases and outbreaks of gastroenteritis in Hong Kong. **J Med Virol.** 2004 May;73(1): 113-7.

Lee TW, Kurtz JB. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. **J Gen Virol.** 1981; 57(Pt 2): 421-4.

Leite JP, Barth OM, Schatzmayr HG. Astrovirus in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1991; 86(4): 489-90.

Lew JF, Moe CL, Monroe SS, Allen JR, Harrison BM, Forrester BD, et al. Astrovirus and adenovirus associated with diarrhea in children in day care settings. **J Infect Dis.** 1991; 164(4): 673-8.

Lindesmith L, Moe C, Lependu J, Frelinger JA, Treanor J, Baric RS. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. **J Virol.** 2005; 79(5): 2900-9.

Liu C, Grillner L, Jonsson K, Linde A, Shen K, Lindell AT, Wirgart BZ, Johansen K. Identification of viral agents associated with diarrhea in young children during a winter season in Beijing, China. **J Clin Virol.** 2006; 35(1): 69-72.

Liu CY, Shen KL, Wang SX, Liu YY, Zhaori GT. Astrovirus infection in young children with diarrhea hospitalized at Beijing Children's Hospital. **Chin Med J (Engl)**. 2004; 117(3): 353-6.

Lochridge VP, Hardy ME. Snow Mountain virus genome sequence and virus-like particle assembly. **Virus Genes**. 2003; 26(1): 71-82.

Lopman BA, Adak GK, Reacher MH, Brown DWG. Two epidemiological patterns of Norovirus outbreaks: Surveillance in England and Wales, 1992-2000. **Em Infect Dis**. 2003; 9: 71-77.

Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. **Clin Infect Dis**. 2004; 39(3): 318-24.

Maass G, Baumeister HG, Hergemoller R, Jansen P, Schumacher H. Visualization by electronmicroscopy of 28 nm virusparticles (astroviruses) in faeces of newborns with acute nonbacterial gastroenteritis. **Zentralbl Bakteriol**. 1978; 242(4): 423-30.

Madeley CR. Comparison of the features of astroviruses and caliciviruses seen in samples of feces by electron microscopy. **J Infect Dis**. 1979; 139(5): 519-23.

Madeley C. R., Cosgrove B. P. 28nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. **Lancet**.1975; 1: 451-452.

Marie-Cardine A, Goullain K, Mouterde O, Castignolles N, Hellot MF, Mallet E, Buffet-Janvresse C. Epidemiology of acute viral gastroenteritis in children hospitalized in Rouen, France. **Clin Infect Dis**. 2002; 34(9): 1170-8.

Marionneau S, Airaud F, Bovin NV, Le Pendu J, Ruvoen-Clouet N. Influence of the combined ABO, FUT2, and FUT3 polymorphism on susceptibility to Norwalk virus attachment. **J Infect Dis**. 2005; 192(6): 1071-7.

Marshall JA, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Cox BJ, Catton MG. Incidence and characteristics of endemic Norwalk-like virus-associated gastroenteritis. **J Med Virol.** 2003; 69: 568–578.

Matsui S. M., Greenberg H. B. Astroviruses. In: Knipe D. M., Howley P. M., Chanock R. M., Melnick J. L., Monath T. P., Roizman B., Straus S. E. (eds.). **Fields in Virology.** Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 4th ed. vol 1, p. 875-893, 2001.

Maunula L. Norovirus outbreaks from drinking water. **Emerg Infect Dis.** 2005; 11(11): 1716-21.

Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Arch Virol.** 2002; 147(8): 1655-63.

Medina SM, Gutierrez MF, Liprandi F, Ludert JE. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. **J Clin Microbiol.** 2000; 38(9): 3481-3.

Mendez E, Fernandez-Luna T, Lopez S, Mendez-Toss M, Arias CF. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. **J Virol.** 2002; 76(16): 7996-8002.

Mendez E, Salas-Ocampo MP, Munguia ME, Arias CF. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. **J Virol.** 2003; 77(21): 11378-84.

Mendez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, Guiscafere H, Cedillo R, Munoz O, Herrera I, Lopez S, Arias CF. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. **J Clin Microbiol.** 2004; 42(1): 151-7.

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

- Mitchell DK. Astrovirus gastroenteritis. **Pediatr Infect Dis J.** 2002; 21(11): 1067-9.
- Molberg O, Nilsen EM, Sollid LM, Scott H, Brandtzaeg P, Thorsby E, Lundin KE. CD4+ T cells with specific reactivity against astrovirus isolated from normal human small intestine. **Gastroenterology.** 1998; 114(1): 115-22.
- Moreno-Espinosa S, Farkas T, Jiang X. Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. **Semin Pediatr Infect Dis.** 2004; 15(4): 237-45.
- Mustafa H, Palombo EA, Bishop RF. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. **J Clin Microbiol.** 2000; 38(3): 1058-62.
- Naficy AB, Rao MR, Holmes JL, Abu-Elyazeed R, Savarino SJ, Wierzba TF, Frencck RW, Monroe SS, Glass RI, Clemens JD. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. **J Infect Dis.** 2000; 182(3): 685-90.
- Nicollier-Jannot B, Ogier A, Piroth L, Pothier L, Kohli E. Recombinant virus-like particles of a norovirus (genogroup II strain) administered intranasally and orally with mucosal adjuvants LT and LT (R192G) in BALB/c mice induce specific humoral and cellular Th/Th2-like immune responses. **Vaccine** 2004; 22 (9-10):1079-86
- Ng TL, Chan PP, Phua TH, Loh JP, Yip R, Wong C, et al. Oyster-associated outbreaks of Norovirus gastroenteritis in Singapore. **J Infect.** 2005; 51(5): 413-8.
- Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. **J Clin Microbiol.** 1995; 33(4): 797-801.
- Okada M, Ogawa T, Kaiho I, Shinozaki K. Genetic analysis of noroviruses in Chiba Prefecture, Japan, between 1999 and 2004. **J Clin Microbiol.** 2005; 43(9): 4391-401.

O'Ryan ML, Mamani N, Gaggero A, Avendano LF, Prieto S, Pena A, Jiang X, Matson DO. Human caliciviruses are a significant pathogen of acute sporadic diarrhea in children of Santiago, Chile. **J Infect Dis.** 2000; 182(5): 1519-22.

Pager CT, Steele AD. Astrovirus-associated diarrhea in South African adults. **Clin Infect Dis.** 2002; 35(11): 1452-3.

Pang XL, Honma S, Nakata S, Vesikari T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. **J Infect Dis.** 2000; 181 Suppl 2: S288-94.

Pang XL, Preiksaitis JK, Lee B. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. **J Clin Virol.** 2005; 33(2): 168-71.

Parashar UD, Bresee JS, Glass RI. The global burden of diarrhoeal disease in children. **Bull World Health Organ.** 2003; 81(4): 236.

Parashar UD, Li JF, Cama R, DeZalia M, Monroe SS, Taylor DN, Figueroa D, Gilman RH, Glass RI. Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. **J Infect Dis.** 2004; 190(6): 1088-92.

Parashar UD, Monroe SS. "Norwalk-like viruses" as a cause of foodborne disease outbreaks. **Rev Med Virol.** 2001; 11(4): 243-52.

Parks CG, Moe CL, Rhodes D, Lima A, Barrett L, Tseng F, Baric R, Talal A, Guerrant R. Genomic diversity of "Norwalk like viruses" (NLVs): pediatric infections in a Brazilian shantytown. **J Med Virol.** 1999; 58(4): 426-34.

Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. **J Med Virol.** 2004; 73(2): 256-61.

Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. **Science.** 1999; 286(5438): 287-90.

Prasad BV, Matson DO, Smith AW. Three-dimensional structure of calicivirus. **J Mol Biol.** 1994; 240(3): 256-64.

Qiao H, Nilsson M, Abreu ER, Hedlund KO, Johansen K, Zaori G, Svensson L. Viral diarrhea in children in Beijing, China. **J Med Virol.** 1999; 57(4): 390-6.

Ratcliff RM, Doherty JC, Higgins GD. Sensitive detection of RNA viruses associated with gastroenteritis by a hanging-drop single-tube nested reverse transcription-PCR method. **J Clin Microbiol.** 2002; 40(11): 4091-9.

Risco C, Carrascosa JL, Pedregosa AM, Humphrey CD, Sanchez-Fauquier A. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. **J Gen Virol.** 1995; 76 (Pt 8): 2075-80.

Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinje J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, Koopmans M. Natural history of human calicivirus infection: A prospective cohort study. **Clin Infect Dis.** 2002; 35: 246–253.

Rodriguez-Baez N, O'Brien R, Qiu SQ, Bass DM. Astrovirus, adenovirus, and rotavirus in hospitalized children: prevalence and association with gastroenteritis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** 2002; 35(1): 64-8.

Rodriguez-Guillen L, Vizzi E, Alcalá AC, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. **J Clin Virol.** 2005; 33(2): 104-9.

Rohayem J, Berger S, Juretzek T, Herchenroder O, Mogel M, Poppe M, et al. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. **J Virol Methods.** 2004; 118(1): 49-59.

Royuela E, Negrodo A, Sanchez-Fauquier A. Development of a one step real-time RT-PCR method for sensitive detection of human astrovirus. **J Virol Methods.** 2005.

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Rev Med Virol.** 2005; 15(1): 29-56.

Santos RAT. **Identificação de Astrovírus por RT-PCR e cultivo viral em células CaCo-2 a partir de espécimes fecais de crianças de Brasília – Distrito Federal e Goiânia – Goiás.** Goiânia-GO; 2005. Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical] – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG.

Schaub SA, Oshiro RK. Public health concerns about caliciviruses as waterborne contaminants. **J Infect Dis.** 2000; 181(Suppl 2): S374–S380.

Schnagl RD, Belfrage K, Farrington R, Hutchinson K, Lewis V, Erlich J, Morey F. Incidence of human astrovirus in central Australia (1995 to 1998) and comparison of deduced serotypes detected from 1981 to 1998. **J Clin Microbiol.** 2002; 40(11): 4114-20.

Shi M, Sikotra S, Lee T, Kurtz JB, Getty B, Hart CA, Myint SH. Use of a nested PCR method for the detection of astrovirus serotype 1 in human faecal material. **Mol Cell Probes.** 1994; 8(6): 481-6.

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

Silva AM, Leite EG, Assis RM, Majerowicz S, Leite JP. An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 in a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2001; 96(8): 1069-73.

Simpson R, Aliyu S, Iturriza-Gómara M, Desselberger U, Gray J. Infantile viral gastroenteritis: on the way to closing the diagnostic gap. **J Med Virol.** 2003; 70:258-262.

Stewien KE, Durigon EL, Tanaka H, Gilio AE, Baldacci ER. Occurrence of human astrovirus in Sao Paulo City, Brazil. **Rev Saude Publica.** 1991; 25(2): 157-8.

- Tacket CO. Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. **Vaccine** 2005; 23 (15):1866-9.
- Tai JH, Ewert MS, Belliot G, Glass RI, Monroe SS. Development of a rapid method using nucleic acid sequence-based amplification for the detection of astrovirus. **J Virol Methods**. 2003; 110(2): 119-27.
- Tan M, Hegde RS, Jiang X. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. **J Virol**. 2004; 78(12): 6233-42.
- Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. **J Virol**. 2003; 77(23): 12562-71.
- Tatsumi M, Nakata S, Sakai Y, Honma S, Numata-Kinoshita K, Chiba S. Detection and differentiation of Norwalk virus by reverse transcription-polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. **J Med Virol**. 2002; 68: 285–290.
- Taylor MB, Walter J, Berke T, Cubitt WD, Mitchell DK, Matson DO. Characterisation of a South African human astrovirus as type 8 by antigenic and genetic analyses. **J Med Virol**. 2001; 64(3): 256-61.
- Thornton AC, Jennings-Conklin KS, McCormick MI. Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. **Disaster Manage Response**. 2004; 2(1): 4-9.
- Unicomb LE, Banu NN, Azim T. Astrovirus infection in association with acute, persistent, and nosocomial diarrhea in Bangladesh. **Pediatr Infect Dis J**. 1998; 17: 611.
- Walter J. E., Mitchell D. K. Astrovirus infection in children. **Current Opinion in Infect Dis**. 2003; 16: 247-253.
- Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. **Clin Microbiol Infect**. 2003; 9(4): 247-62.
- World Health Report 2005. **World Health Organization** [online]. 2005. [capturado 10 dic. 2005]. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2005/en/>.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology**. 2005.

Zintz C, Bok K, Parada E, Barnes-Eley M, Berke T, Staat MA, et al. Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. **Infect Genet Evol**. 2005; 5(3): 281-90.

Anexo 1- Ficha de Informações Clínicas e Epidemiológicas