

Hugo Reis Resque

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ASTROVÍRUS
EM AMOSTRAS FECAIS DE CRIANÇAS COM GASTROENTERITE
EM SÃO PAULO, BRASIL.**

Tese apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

**São Paulo
2007**

RESUMO

RESQUE, H. R. **Caracterização molecular de astrovírus em amostras fecais de crianças com gastroenterite em São Paulo, Brasil.** 2007. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar astrovírus em amostras fecais coletadas de crianças com e sem diarreia, em São Paulo, Brasil, e divididas em dois grupos, EPM e HU, de acordo com a origem. A detecção foi realizada utilizando-se *RT-PCR*, com *primers* específicos. Os resultados para as amostras EPM mostram que 66/234 (28,2%) foram positivas para astrovírus. Para as amostras HU, 18/187 (9,6%) foram positivas. A genotipagem foi realizada com a técnica de *nested/RT-PCR*. De 66 amostras positivas (EPM), 19 (28,7%) foram caracterizadas como HAstV-1, 4 (6,0%) como HAstV-2, 2 (3,0%) como HAstV-3, 1 (1,5%) como HAstV-5 e 3 (4,5%) como HAstV-8. Das 18 positivas do HU, 1 (5,5%) amostra foi caracterizada como HAstV-1, 7 (38,8%) como HAstV-2 e 1 (5,5%) como HAstV-8. As amostras genotipadas em ambos os grupos foram submetidas ao Seqüenciamento de nucleotídeos para confirmação dos resultados. Detecção e genotipagem de astrovírus em casos de diarreias pediátricas são técnicas são importantes e descrevem como esse vírus está circulando em São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: astrovírus, gastroenterite, *RT-PCR*, seqüenciamento, genotipagem.

ABSTRACT

RESQUE, H. R. **Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children with gastroenteritis in São Paulo, Brazil.** 2007. 99 f. Thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The purpose of this study was to characterize astrovirus in faecal samples collected from children with and without diarrhea in São Paulo city, Brazil, and grouped into two distinct groups, EPM and HU. Detection was carried out using RT-PCR with specific primers. Results for EPM set showed that 66/234 (28,2%) were positive. In the HU set of samples, 18/187 (9,6%) were positive for astrovirus. Genotyping was carried out with nested/RT-PCR. Out of 66 astrovirus positive EPM samples, 19 (28,7%) were characterized as HAstV-1, 4 (6,0%) as HAstV-2, 2 (3,0%) as HAstV-3, 1 (1,5%) as HAstV-5 and 3 (4,5%) as HAstV-8. Among 18 astrovirus positive HU samples, 1 (5,5%) was characterized as HAstV-1, 7 (38,8%) as HAstV-2 and 1 (5,5%) as HAstV-8. Genotyped samples were confirmed by nucleotide sequencing. Detection and genotyping of astrovirus in pediatric diarrhea are important and describes how this virus is circulating in São Paulo, Brazil.

Keywords: astrovirus, gastroenteritis, genotyping, RT-PCR, nucleotide sequencing.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A inflamação da mucosa do trato intestinal, ou gastroenterite (WEBB; STAR, 2005), é uma das doenças mais comuns que acometem a humanidade, estimando-se cerca de 1,5 bilhão de casos por ano, tendo maior impacto principalmente em crianças e idosos (GLASS et al., 2001). De acordo com um estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde, estima-se que haja aproximadamente de 1,6 a 2,5 milhões de mortes causadas por diarreia a cada ano, e de que crianças - na maioria com menos de 5 anos de idade - apresentem uma média anual de três episódios de diarreia, em países em desenvolvimento (HILL-KING et al., 2005). Em países industrializados, a mortalidade associada à gastroenterite é baixa, mas em virtude de sua alta incidência, a sobrecarga social e os custos na economia devido aos cuidados com crianças doentes e a ausência dos pais no trabalho são substanciais (OLESEN et al., 2005). Nos Estados Unidos, a hospitalização e o tratamento de crianças com menos de 5 anos de idade, com quadro de gastroenterite aguda, chega a custar US\$ 250 milhões por ano (TUCKER et al., 1998). Quando considerada a ausência no trabalho por parte dos pais, o custo da gastroenterite aguda passa a ser estimado em US\$ 1 bilhão por ano (KING et al., 2003).

Os sintomas predominantes, diarreia e vômito, são comuns em infecções causadas por mais de 20 agentes etiológicos diferentes. O espectro da doença abrange desde uma infecção assintomática, passando por vômito ou diarreia

moderados, ou ambos, até um quadro severo da doença, resultando em desidratação e/ou, em alguns casos, na morte (GLASS et al., 2001).

Nos países desenvolvidos, os vírus são a principal causa de diarreia aguda, chegando a ser responsáveis por até 80% das doenças causadas por ingestão de alimentos (MEAD et al., 1999).

Os rotavírus e os norovírus são reconhecidos como sendo as principais causas de diarreia viral em crianças e adultos (THORNTON et al., 2004). No entanto, atualmente, os astrovírus têm sido associados a aproximadamente 2-8% dos casos de gastroenterite infantil aguda, não-bacteriana, tanto em países desenvolvidos, quanto em países em desenvolvimento (FAUQUET et al., 2005). Dessa maneira, os astrovírus podem ser considerados a segunda maior causa de gastroenterite aguda em crianças com até 5 anos de idade (ROYUELA et al., 2005), sendo os rotavírus a principal causa (OLESEN et al., 2005).

Anteriormente associado à surtos isolados de diarreia, o astrovírus também está presente em infecções nosocomiais e casos de gastroenterite persistente em pessoas imunocomprometidas (DE GRAZIA et al., 2004).

A infecção por astrovírus é endêmica, e estudos sorológicos indicam que a maioria das pessoas já foram expostas a esse patógeno (KRISTON et al., 1996).

1.2 Histórico

Os astrovírus foram associados à gastroenterite infantil, pela primeira vez, em 1975, por Madeley e Cosgrove. Estes autores observaram, ao microscópio eletrônico, partículas que, na época, foram denominadas de pequenos vírus estruturados e arredondados (*Small Round Structured Viruses* - **SRSV**) (MADELEY; COSGROVE, 1975). O primeiro astrovírus descrito na literatura não apresentava o capsídeo na forma característica de estrela. Alguns meses antes de sua nomenclatura, Appleton e Higgins descreveram um surto de diarreia moderada em crianças de uma maternidade na Inglaterra. Testes com amostras dessas crianças, através da microscopia eletrônica, revelaram que tais vírus possuíam morfologia e tamanho diferentes dos vírus Norwalk e rotavírus já previamente identificados. Somente após alguns anos, quando reagentes imunológicos específicos foram obtidos, foi possível a identificação daquele agente etiológico, sendo considerado um astrovírus (APPLETON; HIGGINS, 1975). No entanto, somente há pouco tempo, com o aprimoramento de algumas técnicas de diagnóstico, tornou-se possível um melhor entendimento desse vírus enquanto agente causador de diarreia (MEDINA et al., 2000).

Uma importante descoberta foi feita em 1981, pelos pesquisadores Lee e Kurtz, quando conseguiram isolar e cultivar astrovírus de humano (HAstV) com várias passagens, em linhagem celular. Eles descobriram, com esse estudo, que o astrovírus podia se propagar em linhagens celulares, diferenciando-se claramente dos vírus Norwalk e de outros calicivírus de humanos, que não apresentam essa característica (LEE; KURTZ, 1981). Esta descoberta também

contribuiu para o reconhecimento de 5 sorotipos de astrovírus de humanos em 1984 (KURTZ; LEE, 1984), além do desenvolvimento, no final dos anos 80, de um ensaio imunoenzimático capaz de detectar antígenos virais (HERRMANN et al., 1988; HERRMANN et al., 1990), da confirmação de sua importância médica em 1991 (HERRMANN et al., 1991) e da clonagem e seqüenciamento do genoma desses vírus em 1993/94 (JIANG et al., 1993; LEWIS et al., 1994; WILLCOCKS, et al., 1994). A hipótese da existência de dois novos sorotipos (6 e 7) foi sugerida em 1994 (LEE; KURTZ, 1994). Posteriormente, um oitavo tipo de astrovírus foi sugerido, baseando-se em estudos de genotipagem de uma cepa de HAstV isolada no Reino Unido (BELLIOT et al., 1997). Até o momento, nenhum estudo relatou a existência de outros sorotipos de astrovírus de humanos.

Além de humanos, os astrovírus já foram detectados em amostras de fezes de gatos (FAstV), bezerros (BAstV), veados, cães, patos (DAstV), camundongos, porcos (PAstV), ovelhas (OAstV), visons (MAstV), perus (TAstV) e galinhas (ANV e CAstV) (FAUQUET et al., 2005).

1.3 Estrutura da partícula viral

1.3.1 Morfologia

Os astrovírus são descritos como partículas esféricas de 28 a 30 nanômetros (nm) de diâmetro, não envelopadas e com capsídeo de simetria icosaédrica. Sua principal característica é a superfície do capsídeo em forma de uma estrela de 5 a 6 pontas. Mesmo assim, somente em torno de 10% do total de partículas apresentam o capsídeo com forma de estrela, o que dificulta sua identificação morfológica. Geralmente, os astrovírus estudados são descritos como tendo 28 nm de diâmetro; no entanto, essa medida pode variar de acordo com a fonte da partícula viral (por exemplo, astrovírus de bovinos) ou com o método de preparação para visualização por microscopia eletrônica (ME) (MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

Estudos com amostras de HAstV-2, cultivadas em células renais de macaco Rhesus (LLC-MK2) e na presença de tripsina, revelaram espículas destacando-se na superfície do vírus. Essas partículas possuíam um diâmetro de 41 nm (incluindo as espículas) e não apresentavam a forma de estrela. Entretanto, esta característica dos astrovírus pôde ser induzida após tratamento das células com meio de cultura alcalinizado. Várias tentativas desse tratamento foram realizadas, com diversas alterações de tempo e pH, no entanto, somente após a incubação das células durante 10 minutos e em meio com pH 10, foi possível a observação da forma de estrela de 5 a 6 pontas. Ainda de acordo com esse estudo, pelo menos para o HAstV-2 cultivado em cultura celular, a característica de forma de estrela seria uma transformação da estrutura original

do vírus. Esta transformação diminuiria a integridade viral e precederia a desestruturação da partícula viral (RISCO et al., 1995). Os autores também sugerem que o fato de os astrovírus serem detectados comumente nas fezes, faria com que outros fatores, como a presença de íons ou proteases, causassem alterações na estrutura da superfície desse vírus.

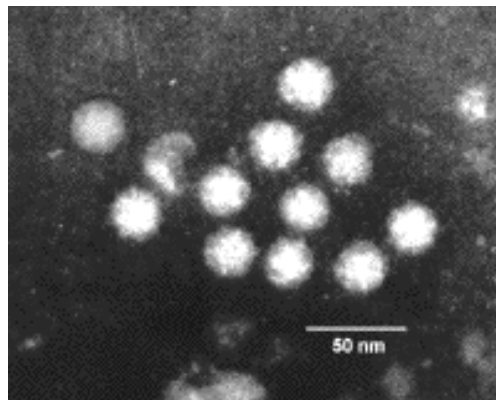


Figura 1: Microscopia eletrônica de partícula viral semelhante à astrovirus. (<http://www.stanford.edu/group/virus/astro/2004ambili/Astrohome.html>)

1.3.2 Genoma

O genoma do astrovírus é constituído por RNA de fita simples (ssRNA), de polaridade positiva, com extensão que pode variar de 6.4 kb (OAstV-1) até 7.3 kb (TAstV-2), excluindo a cauda poli-A na extremidade 3' (Figura 2). Durante a infecção de células susceptíveis, duas espécies de RNA podem ser observadas: um RNA genômico (gRNA) e um RNA subgenômico (sgRNA), de aproximadamente 2.4 kb) (KOCI et al., 2000). Estudos utilizando células LLC-MK2 revelaram que ambos os RNAs são detectados 12 horas após o início da infecção (MONROE et al., 1991).

O genoma viral possui três janelas abertas de leitura (*Open Reading Frames - ORF*): ORF1a, ORF1b e ORF2. As ORFs 1a e 1b estão localizadas na extremidade 5' do genoma e codificam proteínas não-estruturais, possivelmente envolvidas na transcrição e replicação do RNA. A ORF2 está localizada na extremidade 3', é comum aos RNAs genômico e subgenômico e codifica as proteínas do capsídeo (MATSUI et al., 2001; MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

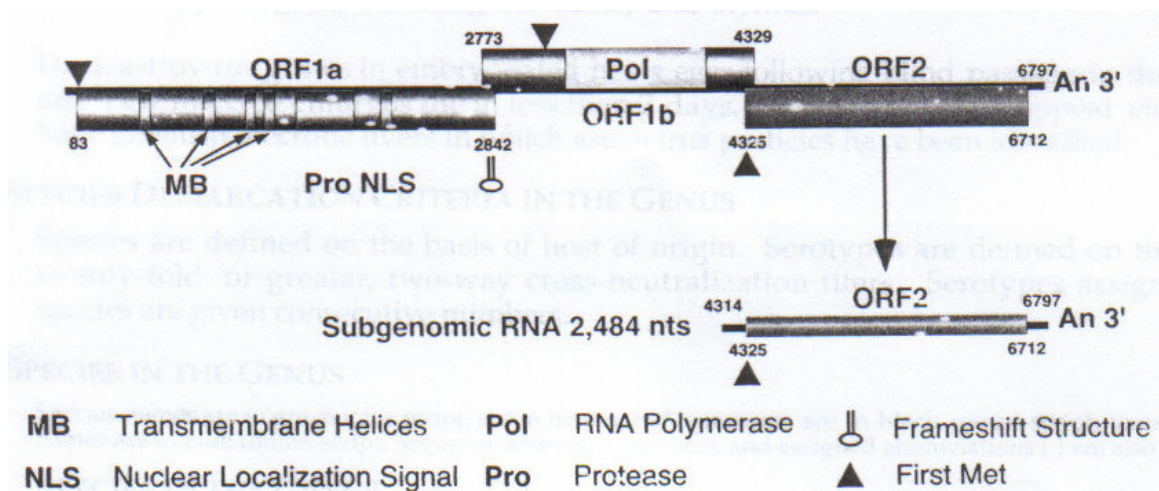


Figura 2: Representação gráfica do genoma de astrovírus (FAUQUET et al., 2005). MB = Hélices Transmembranas; NLS = Sinal para Localização Nuclear; Pol = RNA Polimerase; Pro = Protease; *Frameshift Structure* = Estrutura de *frameshift*; *First Met* = Ponto de partida.

1.3.3 Proteínas virais

A composição protéica do vírion, bem como o mecanismo através do qual as proteínas são sintetizadas, ainda não estão completamente esclarecidos. No entanto, sabe-se que as ORFs 1a e 1b codificam duas poliproteínas não-estruturais: nsp1a (103kDa), codificada pela ORF1a, e nsp1ab (160kDa), codificada pelas ORFs1a e 1b. A nsp1a contém motivos para uma serina

protease, quatro proteínas transmembranas hidrofóbicas e uma proteína que sinaliza a localização nuclear. A nsp1ab possui motivos característicos de RNA polimerase - RNA dependente (MÉNDEZ et al., 2003). Além disso, acredita-se também que tais poliproteínas não-estruturais estejam envolvidas na replicação do RNA viral. Como pode ser inferido para outros vírus de RNA com polaridade positiva, acredita-se que as poliproteínas não-estruturais dos astrovírus sejam clivadas em polipeptídeos menores principalmente pela protease viral (MÉNDEZ et al., 2003). Vale ressaltar que as proteínas não-estruturais de astrovírus podem ser detectadas após 6 horas do início da infecção, mas somente através de imunoenaios utilizando anticorpos específicos (MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

A ORF2 codifica para as proteínas estruturais de astrovírus. Essas proteínas são sintetizadas como uma poliproteína precursora de aproximadamente 780 resíduos de aminoácidos, que por sua vez é clivada e processada em pelo menos três polipeptídeos distintos que formam o capsídeo do vírus. O tamanho das proteínas estruturais varia de acordo com o sorotipo do vírus, podendo apresentar aproximadamente 34, 29 e 26 kDa cada uma (MÉNDEZ et al., 2003). Baseando-se na cepa Yuc-8 de HAstV, o primeiro produto da ORF2, a VP90, é inicialmente clivada na VP70, que é encontrada em partículas virais purificadas. O vírus que contém a VP70 apresenta pouca ou nenhuma infectividade e necessita de um tratamento com tripsina para ativá-lo. Durante esse tratamento, a VP70 é inicialmente clivada e processada, resultando nos polipeptídeos VP41 e VP28, que mais tarde serão clivados nas

proteínas VP34, VP27 e VP25, para produzir o vírus infeccioso (MÉNDEZ et al., 2004).

1.4 Propriedades físico-químicas da partícula viral

O vírion possui uma densidade de 1.36-1.39 g/cm³ em cloreto de cério (CsCl) (FAUQUET et al., 2005). As partículas de astrovírus mostram-se estáveis em pH 3 e são resistentes ao clorofórmio, a uma variedade de detergentes e a solventes lipídicos. O HAstV mantém a infectividade mesmo após 5 minutos a uma temperatura de 60 °C, mas a perde se o tempo de permanência ultrapassar 10 minutos. À temperaturas extremamente baixas (-70 °C a -85 °C) os vírus permanecem estáveis por vários anos. No entanto, se houver uma seqüência contínua de congelamentos e descongelamentos, a partícula viral pode vir a se romper (MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

1.5 Nomenclatura e classificação

Antes conhecido como pequenos vírus estruturados e arredondados (***Small Round Structured Viruses-SRSV***), o astrovírus foi assim denominado pela primeira vez em 1975, quando Madeley e Cosgrove observaram, ao microscópio eletrônico, que algumas partículas virais exibiam um capsídeo com forma semelhante a uma estrela (*astron*=estrela, em grego) (MADELEY; COSGROVE, 1975).

A organização genômica dos astrovírus, onde as ORFs codificam proteínas não-estruturais (ORF1a e ORF1b) na extremidade 5', e proteínas

estruturais (ORF2) na extremidade 3', assemelha-se à organização genômica dos calicivírus. No entanto, algumas características serviram para separar os astrovírus dos calicivírus e de outros grupos de vírus. Tais características dos astrovírus são: o número, tamanho e processamento de poliproteínas; a falta de um domínio RNA-helicase; o uso de um mecanismo ribossomal de *frameshift* para traduzir a RNA polimerase RNA-dependente; suas características morfológicas e o fato de poder ser cultivado em linhagens celulares. Por estas razões, os astrovírus foram classificados em uma nova família viral, a *Astroviridae* (MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

De acordo com o oitavo comunicado do Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus (*International Committee on the Taxonomy of Viruses – ICTV*), a família *Astroviridae* está subdividida em dois gêneros: *Avastrovirus* (astrovírus que infectam aves) e *Mamastrovirus* (astrovírus que infectam mamíferos), sendo que à última pertence a espécie *Human astrovirus* (HAstV), de astrovírus que infectam humanos (FAUQUET et al., 2005). Essa definição dos gêneros foi baseada principalmente na origem do vírus (hospedeiro) e na estrutura do genoma. Entretanto, sabe-se que as espécies que compõem o gênero *Mamastrovirus* encontram-se muito mais relacionadas entre si do que as espécies que compõem o gênero *Avastrovirus* e que nenhuma relação sorológica entre espécies de gêneros diferentes, ou dentro de um mesmo gênero, pôde ser observada até o momento (MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

Em relação aos sorotipos/genotipos de astrovírus de humanos, foram identificados até o momento 8 tipos (HAstV-1 a HAstV-8), sendo que o HAstV-1

ainda é subdividido em quatro sub-tipos (1a, 1b, 1c e 1d). Tal subdivisão baseia-se na análise de uma seqüência contida na ORF2 (MARSHALL et al., 2007). Os sorotipos de astrovírus foram classificados de acordo com a reatividade da proteína do capsídeo a anticorpos tipo-específicos. Esses oito sorotipos ou grupos antigênicos correlacionam-se perfeitamente com genotipos distintos, que foram determinados pela seqüência de nucleotídeos de 348 pb em uma região da ORF2, que demonstrou ter uma notável variabilidade (BHATTACHARYA et al., 2006). Outra região conservada de 449 pb localizada na região do capsídeo (do nucleotídeo 4526 ao 4974) pode ser amplificada pelo par de primers MON269 e MON270 e passou a ser detectada em todos os sorotipos (NOEL et al., 1995). Quanto aos genogrupos, existem dois: genogrupo A (HAstV-1 a 5 e o HAstV-8) e genogrupo B (HAstV-6 e 7) (MATSUI et al., 2001). Estes genogrupos foram classificados através da análise filogenética de uma seqüência de nucleotídeos de 289 pb de uma região altamente conservada na ORF1a (BHATTACHARYA et al., 2006).

Os astrovírus são aparentemente espécie-específicos e não há relatos de transmissão interespecies (JONASSEN et al., 2001), tendo sido identificados até o momento em amostras de fezes de humanos, gatos, bezerros, veados, cães, patos, camundongos, porcos, ovelhas, visons, perus e galinhas. As espécies de astrovírus foram definidas tendo como base o hospedeiro e nenhuma espécie-tentativa foi relatada até o momento (FAUQUET et al., 2005).

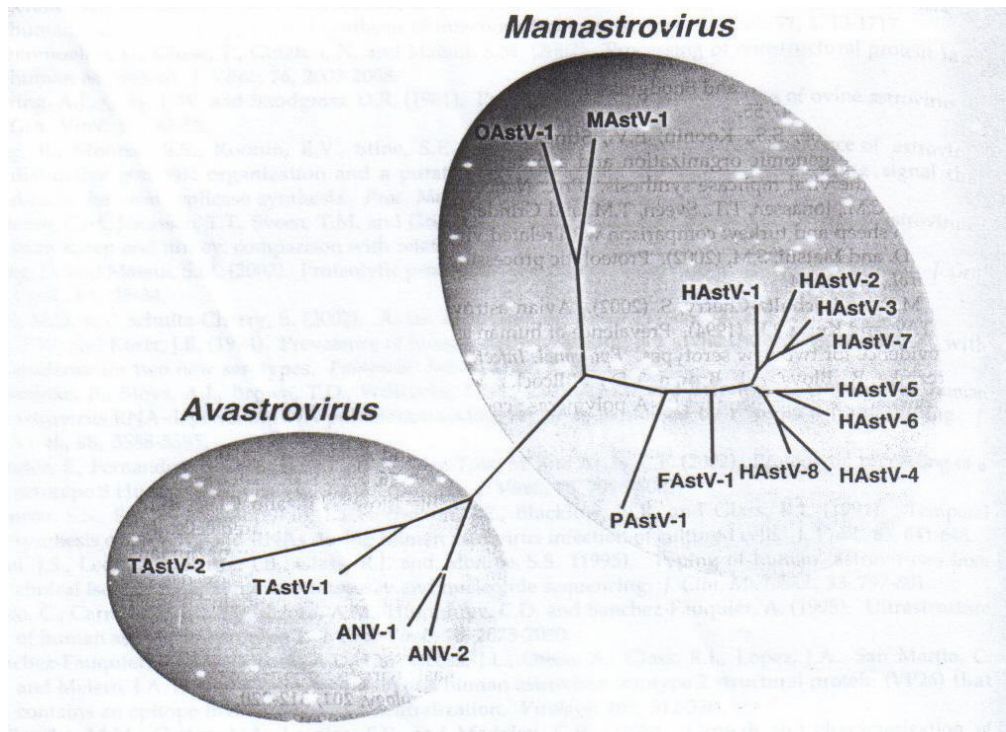


Figura 3: Árvore filogenética representando os dois gêneros da família *Astroviridae*, e suas respectivas espécies e sorotipos (FAUQUET et al., 2005).

1.6 Replicação viral

As informações referentes à replicação dos astrovírus ainda não são muito completas. No entanto, alguns estudos tentam elucidar o mecanismo através do qual esse patógeno se replica.

A estratégia utilizada pelo astrovírus para replicar e transcrever seu genoma seria semelhante à utilizada pelos vírus do gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*. Assim sendo, o RNA genômico (gRNA) seria utilizado como molde para sintetizar um RNA de polaridade negativa, que por sua vez seria utilizado também como molde para produção dos RNAs genômico e subgenômico. A síntese deste RNA subgenômico (sgRNA) requer uma seqüência localizada no

RNA de polaridade negativa que funciona como promotor para a transcriptase viral (MÉNDEZ; ARIAS, 2007). Em um outro trabalho, sugere-se que uma seqüência de 120 nucleotídeos, localizada na ORF2, poderia ser parte do promotor para a síntese do sgRNA (WALTER et al., 2001). Parte dessa região possui uma seqüência que é altamente conservada entre os membros da família *Astroviridae*. Essa seqüência apresenta identidade com a seqüência da extremidade 5' do sgRNA, independente da espécie animal da qual a cepa de astrovírus fora isolada, sugerindo que a seqüência em questão desempenhe um importante papel na replicação do astrovírus (MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

No que diz respeito à liberação do vírus da célula, um estudo envolvendo uma cepa de HAstV-8 sugere que a poliproteína VP90-VP70 esteja envolvida nesse mecanismo. Foi demonstrado que a VP90 organiza-se dentro da célula para formar partículas virais precursoras, que então são processadas por caspases, através de pelo menos quatro clivagens, para produzir partículas virais contendo a proteína VP70. O processamento da poliproteína VP90-VP70 promove a liberação das partículas virais de dentro da célula. Sendo assim, como as partículas que contém VP90-VP70 só se tornam infecciosas após tratamento com tripsina, foi sugerido que o processamento da VP90 em VP70, pela ação das caspases, é importante apenas na liberação do vírus da célula, mas não na montagem da partícula viral ou na aquisição de infectividade. A VP70 confere infectividade ao vírus apenas após ter sido clivada em VP34, VP27 e VP25 (MÉNDEZ et al., 2004).

Nesse mesmo trabalho, observou-se também que a infecção por astrovírus em linhagem celular CaCo-2 causa apoptose e que esse mecanismo parece ser comum para todos os astrovírus. Esta apoptose é caracterizada pela fragmentação do DNA da célula infectada e alteração no potencial transmembranico mitocondrial. O HAstV-8 aperfeiçoou um mecanismo que se beneficia dessa morte celular para completar o ciclo de replicação viral. A apoptose induzida pelo astrovírus regularia o processamento da poliproteína VP90-VP70 e o tempo para liberação das partículas virais infecciosas. Entretanto, ainda faz-se necessário esclarecer qual produto do astrovírus é responsável pela indução dessa morte celular, qual caspase promove a clivagem da poliproteína VP90-VP70 e qual o papel desse processamento na formação do vírus e sua liberação da célula (MÉNDEZ et al., 2004).

1.7 Patogênese e características clínicas

A patogênese da infecção por astrovírus em humanos tem sido bastante estudada. Estudos histopatológicos recentes envolvendo uma criança imunocomprometida, infectada com astrovírus e apresentando um quadro de diarreia pronunciada, revelaram que a infecção por esse patógeno estava limitada ao intestino delgado. A infecção envolvia células epiteliais maduras próximas da região apical das vilosidades, e foi mais intensa no jejuno do que no duodeno, mas não no estômago. Anormalidades morfológicas no intestino sugerem que, apesar da diarreia severa, a resposta inflamatória não esteja primariamente envolvida na patogênese do astrovírus (MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

Em um trabalho realizado com indivíduos com quadro de infecção sintomática causada por HAstV, observou-se que a replicação do vírus estava restrita aos 2/3 da região apical dos enterócitos que recobrem as vilosidades do intestino. Através de técnicas de coloração de partículas virais, pôde-se perceber um aumento progressivo da quantidade de vírus por todo o intestino delgado. Essa descoberta revela que o astrovírus encontra-se presente no intestino delgado, sendo maior a infecção no jejuno, quando comparada ao duodeno (MOSEER; SCHULTZ-CHERRY, 2005).

Em um outro estudo, realizado em 2003, no qual foi utilizada uma ave (peru) como modelo animal, observou-se que uma infecção por TAstV causava inibição do crescimento da ave, diminuição no tamanho do timo e infecção entérica. Além disso, foram observadas também que partículas virais em outros tecidos, além dos tecidos intestinais, e na corrente sangüínea, sugerindo um estágio de viremia durante a infecção. Notou-se que, apesar da diarréia severa, as alterações histopatológicas foram moderadas e não foi observado quadro de inflamação (KOCI et al., 2003). Essa falta de inflamação após uma infecção por astrovírus em humanos e perús, e a habilidade do HAstV em induzir células cultivadas à apoptose sugerem que esta forma programada de morte celular, onde a inflamação não é frequentemente observada, pode contribuir para o desenvolvimento da doença em algumas espécies (MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

Além disso, surtos de diarréia causados por astrovírus em idosos e indivíduos submetidos a transplante de órgãos e quimioterapia, sugerem

fortemente que o sistema imune desenvolva um papel importante na patogênese desse vírus (KOCI et al., 2005).

Mais recentemente, um estudo realizado na Hungria sugeriu a provável associação de intussuscepção à infecção aguda causada por astrovírus. Neste trabalho, foi descrito o caso de uma criança de 28 meses de idade que foi internada em um hospital em Budapeste, apresentando quadro de gastroenterite (diarréia e vômito) e sinais e sintomas típicos de intussuscepção, observados após exame de ultra-som. Testes de laboratório com as fezes coletadas no dia da internação da criança resultaram em negatividade para rotavírus e adenovírus, assim como não foi encontrado nenhum enteropatógeno bacteriano através de métodos rotineiros de cultura de bactérias. Por outro lado, HAstV foi detectado através de ensaio imunoenzimático e *RT-PCR*. De acordo com os pesquisadores envolvidos nesse estudo, esse é o primeiro caso de intussuscepção associado à infecção por astrovírus em uma criança jovem (JAKAB et al., 2007).

O período de incubação do vírus varia de 24 a 36 horas e a diarréia é geralmente moderada, durando em média de 2 a 3 dias e sendo associada a quadros de vômito, dores abdominais, febre e anorexia, que duram normalmente alguns dias. Quadros de desidratação são menos comuns, mas já foram relatados (BHATTACHARYA et al., 2006; GABBAY et al., 2006).

A transmissão do vírus ocorre via fecal-oral, de modo direto ou pelo contato com objetos e/ou pessoas contaminadas. Alguns estudos também sugerem que o astrovírus possa ser transmitido pela água, seja ela potável, de

piscina, de esgoto ou de rio (SMITH et al., 2006; EL-SENOUSY et al., 2006; GUTIERREZ et al., 2006). A presença de partículas virais em superfícies inanimadas também já foi descrita (KRAMER et al., 2006).

O período de excreção do vírus dura normalmente de dois a três dias, mas existem relatos de excreção por períodos prolongados. Os astrovírus também podem ser excretados por indivíduos assintomáticos, favorecendo a transmissão do patógeno (MUSTAFA et al., 2001).

1.8 Imunidade e resistência

A observação de que a infecção por astrovírus possui uma distribuição de idade bifásica (crianças e idosos), além de ser causa comum de diarreia em pacientes imunocomprometidos, levou muitos pesquisadores a concluir que os anticorpos desempenhem papéis muito importantes na resistência contra esse patógeno (KOCI et al., 2005). Essa distribuição de idade bifásica da infecção sintomática sugere que os anticorpos adquiridos na infância protegem o indivíduo durante a maior parte da vida adulta, mas não protegem mais quando o indivíduo passa a ser idoso, período em que a imunidade geral do indivíduo, e conseqüentemente a imunidade contra o astrovírus, diminui (MATSUI; GREENBERG, 2001).

O papel dos anticorpos anti-astrovírus na proteção do organismo foi observado em estudos com voluntários onde indivíduos apresentaram infecção por astrovírus com características mais brandas, enquanto voluntários sem anticorpos anti-astrovírus pré-existentes desenvolveram um quadro de sintomas

da doença mais severo e foram mais propensos a liberar partículas virais. Esse trabalho sugere que anticorpos anti-astrovírus foram capazes de proteger adultos de infecções repetidas (KOCI et al., 2005).

A importância da resposta de anticorpos anti-astrovírus também foi observada em estudos de soroprevalência dos anticorpos anti-astrovírus em diversas populações. Esses estudos demonstraram que entre cinco meses e um ano de vida, 50% das crianças apresentam anticorpos anti-astrovírus, e que, aos cinco anos de idade, esse número é maior de que 90% (KOCI et al., 2005).

O sistema imune de mucosa normal tem um papel importante na proteção de indivíduos contra infecções recorrentes por astrovírus. Foi observado que, células T, que reconhecem antígenos de astrovírus, foram encontradas na lâmina própria intestinal dos adultos. Essas células T CD4⁺ astrovírus-específicas, quando ativadas, produziram células T-helper-subtipo 1, interferon gama (inf- γ) e fator de necrose tumoral (TNF) (MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

Em um estudo realizado por KURTZ et al., 1979, oito voluntários adultos receberam um extrato de fezes filtrado, proveniente de uma criança infectada com astrovírus. Um voluntário apresentou sintomas de gastroenterite moderada e um desenvolveu gastroenterite aguda, caracterizada por vômito, náuseas, dores abdominais e dor de cabeça. Tais sintomas perduraram por 3 dias pós-infecção, com episódios de diarreia aquosa ocorrendo no sexto dia. A diarreia cessou no sétimo dia. Uma amostra de fezes desse voluntário foi filtrada e administrada a outros nove indivíduos, que foram monitorados para sintomas de infecção por astrovírus. Nenhum voluntário apresentou quadro de diarreia aguda, mas em

cinco foram observados sintomas como dor de cabeça, mal-estar e desconforto abdominal. Embora apenas um voluntário, entre todos os envolvidos no estudo tenha apresentado quadro de diarreia aguda, 13 apresentaram um aumento de quatro vezes na concentração de anticorpos contra astrovírus (KURTZ et al., 1979).

Um estudo posterior, realizado por Midthun et al., em 1993, confirmou os achados de Kurtz et al., 1979. Apesar de apenas um voluntário desse novo estudo ter apresentado um quadro de gastroenterite aguda, 9, em 19 inoculados com o vírus, apresentaram também um aumento de quatro vezes na concentração de anticorpos contra astrovírus (MIDTHUN et al., 1993).

Vários estudos têm relatado que o fardo da doença causada por astrovírus é elevado em pacientes que estejam em tratamento por quimioterapia, transplantados, infectados por HIV ou apresentando qualquer outro tipo de imunossupressão. Esses pacientes são susceptíveis a diversos patógenos oportunistas e normalmente sofrem de gastroenterite. No entanto, de acordo com vários estudos, nenhum patógeno aparenta ser o principal causador da enfermidade, mas o astrovírus tem aparecido frequentemente como o principal causador de gastroenterite em pessoas infectadas pelo HIV. Resultados similares também foram relatados em pessoas que fazem uso de drogas imunossupressoras devido a transplante de medula óssea. Foi observado também que pacientes com resposta imune adaptativa prejudicada apresentam uma maior incidência de astrovírus, em comparação aos rotavírus e norovírus (KOCI et al., 2005).

1.9 Epidemiologia

O astrovírus é um agente infeccioso cosmopolita e normalmente acomete crianças de pouca idade. No entanto, casos de diarreia envolvendo idosos, adultos saudáveis, pessoas imunocomprometidas e, até mesmo um grupo de recrutas militares franceses, já foram descritos (BELLIOT et al., 1997; TREVINO et al., 2001; SEBIRE et al., 2004; GABBAY et al., 2005; MOSER et al., 2005; MARSHALL et al., 2007).

Embora a infecção por astrovírus em crianças ocorra ao longo do ano, um padrão sazonal tem sido observado em alguns estudos. Em regiões de clima temperado, a maioria das infecções ocorre nos meses mais frios, no fim do outono e no inverno e em regiões de clima tropical, nos meses de chuva (MUSTAFA et al., 2001). No entanto, alguns estudos não confirmam esse padrão sazonal, como o realizado em Goiânia, Brasil, onde a maioria das infecções por astrovírus ocorreu durante a primavera (CARDOSO et al., 2002).

A infecção ocorre pela via fecal-oral, normalmente de pessoa para pessoa e pode ser observada tanto em casos de gastroenterite esporádica como em surtos hospitalares, em escolas, asilos para idosos e creches (MITCHELL et al., 1999; SILVA et al., 2001; SCHNAGL et al., 2002; AKIHARA et al., 2005).

Em relação aos genótipos/sorótipos de astrovírus de humanos já descritos até o momento, o HAsV-1 continua sendo o mais freqüente no mundo. Os HAsV-2, HAsV-3, HAsV-5 e HAsV-8 são considerados menos comuns e os genótipos/sorótipos 6 e 7 são tidos como raros (NOEL et al., 1995; SAKAMOTO et al., 2000; TRAORÉ et al., 2000; MUSTAFA et al., 2001; GUIX et

al., 2002; MÉNDEZ-TOSS et al., 2004; GALDIERO et al., 2005; GABBAY et al., 2006).

Com relação às co-infecções envolvendo esse patógeno, alguns trabalhos já descreveram misturas entre astrovírus e algum outro vírus causador de gastroenterite (rotavírus, norovírus ou adenovírus), misturas entre três vírus na mesma amostra (astrovírus e mais dois vírus) e infecções por vírus e bactérias causadoras de gastroenterite (BON et al., 1999; MUSTAFA et al., 2000; MÉNDEZ-TOSS et al., 2004; PHAN et al., 2004; GABBAY et al., 2005; BHATTACHARYA et al., 2006; LIU et al., 2006). Essas co-infecções podem levar a uma doença mais severa, de maior duração, com febre mais intensa e episódios de vômito mais freqüentes, se comparada a uma infecção causada apenas por astrovírus (MUSTAFA et al., 2000).

1.10 Diagnóstico laboratorial

Os astrovírus foram detectados pela primeira vez através da visualização de partículas por microscopia eletrônica (ME). Durante muito tempo, a ME, baseada na preparação de amostras fecais com contrastes negativos e subsequente procura por partículas virais, foi o único método disponível para se detectar astrovírus em amostras clínicas. Problemas como congelamento e descongelamento das amostras fecais, degradação de partículas virais por enzimas, presença de anticorpos nas fezes e escolha incorreta de coloração, podem alterar a morfologia das partículas e levar a uma classificação errônea de astrovírus (MUSTAFA et al., 2001). Além disso, o fato de somente 10% das

partículas de astrovírus apresentarem o capsídeo com a forma de estrela característica, também dificulta sua identificação morfológica, contribuindo para possíveis resultados falso-negativos na detecção desse vírus. A sensibilidade da ME tem sido estimada em 10^6 a 10^7 partículas virais por grama de fezes. Normalmente, pacientes com diarreia, causada por infecção por astrovírus, liberam um elevado número de partículas virais (equivalente a aproximadamente 10^{10} ou 10^{11} partículas virais por grama de fezes). No entanto, em pessoas que excretam uma quantidade menor de partículas, o uso de anticorpos antivirais em imunomicroscopia eletrônica (IME) facilita a identificação do vírus (MÉNDEZ; ARIAS, 2007). A IME ainda pode ser utilizada para a sorotipagem de HAsTV, se a técnica for executada com um soro hiperimune tipo-específico de coelho (MUSTAFA et al., 2001).

A possibilidade de cultivar astrovírus em linhagens celulares proporcionou a produção de reagentes, como anticorpos monoclonais e antisoros policlonais. Estes, por sua vez, foram utilizados para desenvolver ensaios imunoenzimáticos (EIE) para a detecção de astrovírus (MUSTAFA et al., 2001). Pode-se dizer que, atualmente, o EIE é um dos principais métodos utilizados para detecção de astrovírus (ROMÁN et al., 2003; MÉNDEZ-TOSS et al., 2004; GABBAY et al., 2005; BHATTACHARYA et al., 2006; LIU et al., 2006), por ser um método rápido quando é necessário testar um grande número de amostras. Além disso, o EIE também pode ser utilizado como método de sorotipagem de amostras clínicas, ao se utilizarem anticorpos sorotipos-específicos, contra antígenos de astrovírus (MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

Outra técnica de detecção bastante utilizada atualmente é a reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (*RT-PCR=Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), que é baseada na amplificação de uma determinada região do genoma viral. As três regiões do genoma do astrovírus (ORF1a, ORF1b e ORF2) podem ser utilizadas para essa amplificação, através de *primers* comuns direcionados para as cada uma delas. (NOEL *et al.*, 1995; MUSTAFA *et al.*, 2001; BHATTACHARYA *et al.*, 2006).

Recentemente, novas técnicas baseadas na *RT-PCR* foram desenvolvidas para se detectar astrovírus. É o caso do *single-step multiplex RT-PCR* e do *one step real time RT-PCR* (ROHAYEM *et al.*, 2004; ROYUELA *et al.*, 2005). Além disso, assim como acontece com o EIE, a técnica de *RT-PCR* também pode ser utilizada como método de genotipagem, utilizando-se *primers* específicos para cada um dos 8 tipos de astrovírus de humanos (SAKAMOTO *et al.*, 2000).

O cultivo em cultura de células pode ser considerada como um método de detecção, se utilizado em combinação com outra técnica, como forma de aumentar a sensibilidade dessa outra técnica, como, por exemplo, a *RT-PCR* (MUSTAFA *et al.*, 1998). No entanto, o cultivo em culturas celulares é um método caro, e que consome muito tempo de trabalho e torna-se inadequado como método de triagem, em se tratando de um número elevado de amostras (MUSTAFA *et al.*, 2000). Em geral, os astrovírus de humanos são capazes de se replicar em três tipos de linhagens celulares: linhagens de adenocarcinoma (CaCo-2, HT-29, T-84 e SK-CO1); linhagens de hepatoma de fígado humano

(PLC/PRF/5) e linhagens derivadas de rim de macaco (MA-104, Cos-1 e vero), sendo essas duas últimas susceptíveis a apenas algumas cepas de HAstV. De todas as linhagens celulares citadas anteriormente, CaCo-2, T-84 e PLC/PRF/5 são as mais eficientes para cultivo de astrovírus diretamente de amostras de fezes (MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

O seqüenciamento genômico de nucleotídeos não é exatamente um método de detecção, mas sim uma técnica para ser utilizada após a detecção, visando a genotipagem de amostras previamente identificadas ou a confirmação de resultados de sorotipagem e/ou genotipagem obtidos por outra técnica (NOEL et al., 1995; WALTER et al., 2001; SCHNAGL et al., 2002; GALLIMORE et al., 2006).

1.11 Tratamento

A gastroenterite causada por astrovírus é considerada uma enfermidade moderada que, apesar de poder prejudicar as atividades diárias de um indivíduo, não necessita de tratamento terapêutico específico. Nas crianças, ou mais raramente nos adultos que ficam desidratados, a reposição oral ou intravenosa de água ou outro fluído nutriente pode resolver o problema. No caso de pessoas imunocomprometidas, que não respondem a um tratamento mais tradicional, a injeção de imunoglobulinas pode ser um importante aliado no combate à doença (MÉNDEZ; ARIAS, 2007). Estudos relatam que após a administração de imunoglobulinas em pacientes imunocomprometidos, com quadro de infecção

persistente causada por astrovírus, foram observadas a eliminação de partículas virais e a extinção do quadro de diarreia (BJORKHOLM et al., 1995).

1.12 Prevenção e controle

Quanto à prevenção e controle da doença causada por astrovírus, a interrupção da transmissão é o fator chave para que a infecção pelo vírus não ocorra. Isso é de grande importância em hospitais e outras instituições, como postos de saúde e creches, onde a transmissão de pessoa para pessoa é comum. Essa interrupção pode ser feita através de hábitos higiênicos simples, como lavar as mãos e manter o ambiente o mais limpo possível, além da adoção de medidas de saneamento básico. O astrovírus é relativamente resistente a vários tipos de produtos de limpeza, incluindo desinfetantes comuns, como o álcool. Além disso, este patógeno pode permanecer viável na água, mesmo após a adição de cloro (MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

Vale ressaltar que a liberação de partículas virais nas fezes pode ocorrer mesmo após o desaparecimento do quadro de diarreia. Por isso, é muito importante que pessoas que trabalham com manuseio e preparo de alimentos tenham em mente a importância de uma boa higiene pessoal e do ambiente de trabalho, além da seleção e cuidado no preparo de certos alimentos já associados a surtos de gastroenterite causada por astrovírus, como as ostras por exemplo (MATSUI; GREENBERG, 2001).

Outro modo de prevenção seria a administração de vacinas. No entanto, mais estudos são necessários para que tal vacina seja desenvolvida. Entretanto,

o fato do astrovírus ser considerado um importante patógeno causador de gastroenterite e da doença atingir crianças da mesma faixa etária do que as infectadas por rotavírus, podem ser vistos como um forte motivo para a criação de uma vacina que protegeria as crianças de infecções causadas pelos dois vírus (MÉNDEZ; ARIAS, 2007).

6 CONCLUSÕES

Após análise e discussão dos resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, pôde-se concluir que:

▶ A técnica de *RT-PCR*, com o uso do par de *primers* MON269/MON270, mostrou-se uma ferramenta eficaz para detecção de astrovírus;

▶ As porcentagens de positividade encontradas para os dois grupos de amostras diferiram entre si, sendo de 9,6% para o grupo do HU e 28,2% para as amostras da EPM;

▶ Amostras apresentando mais de um tipo de vírus foram observadas neste estudo: 53,0% para o grupo EPM e 27,7% no grupo de amostras HU;

▶ Todas as amostras positivas para astrovírus foram submetidas à técnica de genotipagem por *nested/RT-PCR*, e 16 amostras foram posteriormente confirmadas por seqüenciamento de nucleotídeos;

▶ Para o grupo da EPM, em ambas as técnicas de genotipagem, o genótipo mais freqüente foi o HAstV-1;

▶ Para o grupo do HU, o HAstV-2 foi o mais observado na genotipagem por *nested/RT-PCR*, e no seqüenciamento os genotipos encontrados foram o HAstV-3 e HAstV-8;

▶ O seqüenciamento demonstrou ter 71,4% de concordância com a técnica de genotipagem por *nested/RT-PCR*, para as amostras EPM;

▶ O uso em conjunto das técnicas de genotipagem, como *nested/RT-PCR* e seqüenciamento de nucleotídeos, visando a confirmação de resultados, é uma ferramenta importante nos estudos sobre astrovírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIHARA, S.; PHAN, T.G.; NGUYEN, T.A.; HANSMAN, G.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. **Arch. Virol.**, v. 150, n. 10, p. 2061-2075, 2005.

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

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

BELLIOT, G.; LAVERAN, H.; MONROE, S.S. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. **J. Med. Virol.**, v. 51, n. 2, p. 101-106, 1997.

BASU, G.; ROSSOUW, J.; SEBUNYA, T.K.; GASHE, B.A.; DE BEER, M.; DEWAR, J.B.; STEELE, A.D. Prevalence of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection in young children with gastroenteritis in Gaborone, Botswana. **East Afr. Med. J.**, v. 80, n. 12, p. 652-655, 2003.

BHATTACHARYA, R.; SAHOO, G.C.; NAYAK, M.K.; GHOSH, S.; DUTTA, P.; BHATTACHARYA, M.K.; MITRA, U.; GANGOPADHYAY, D.; DUTTA, S.; NIYOGI, S.K.; SAHA, D.R.; NAIK, T.N.; BHATTACHARYA, S.K.; KRISHNAN, T. Molecular epidemiology of human astrovirus infections in Kolkata, India. **Infect. Gen. Evol.**, v. 6, n. 6, p. 425-435, 2006.

BJORKHOLM, M.; CELSING, F.; RUNARSSON, G. Successful intravenous immunoglobulin therapy for severe and persistent astrovirus gastroenteritis after fludarabine treatment in a patient with Waldenstrom's macroglobulinemia. **Int. J. Hematol.**, v. 62, n. 2, p. 117-120, 1995.

BODHIDATTA, L.; LAN, N.T.; HIEN, B.T.; LAI, N.V.; SRIJAN, A.; SERICHANTALERGS, O.; FUKUDA, C.D.; CAM, P.D.; MASON, C.J. Rotavirus disease in young children from Hanoi, Vietnam. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 26, n. 4, p. 325-328, 2007.

BON, F.; FASCIA, P.; DAUVERGNE, M.; TENENBAUM, D.; PLANSON, H.; PETION, A.M.; POTHIER, P.; KOHLI, E. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. **J. Clin. Microbiol.**, p. 3055-3058, 1999.

CARDOSO, D. D. P.; FIACCADORI, F.S.; BORGES DE LIMA DIAS E SOUZA, M.; BRINGEL MARTINS, R.M.; GAGLIARDI LEITE, J.P. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiania, Goias, Brazil. **Med. Sci. Monit.**, v.8, n. 9, p. 624-628, 2002.

CARUZO, T. A. R. **Caracterização de misturas de genótipos G e P de rotavírus de bovino do Estado de Goiás, Brasil:** ocorrência de genótipos característicos de rotavírus de humanos. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CASTILHO, J.G.; MUNFORD, V.; RESQUE, H.R.; FAGUNDES-NETO, U.; VINJE, J.; RACZ, M.L. Genetic diversity of noroviruses among children with gastroenteritis in São Paulo State, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 11, p. 3947-3953, 2006.

COLOMBA, C.; DE GRAZIA, S.; GIAMMANCO, G.M.; SAPORITO, L.; SCARLATA, F.; TITONE, L.; ARISTA, S. Viral gastroenteritis in children hospitalised in Sicily, Italy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 25, n. 9, p. 570-575, 2006.

DALTON, R.M.; ROMAN, E.R.; NEGREDO, A.A.; WILHELMI, I.D.; GLASS, R.I., SANCHEZ-FAUQUIER, A. Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 21, n. 11, p. 1038-1041, 2002.

DE GRAZIA, S.; GIAMMANCO, G.M.; COLOMBA, C.; CASCIO, A.; ARISTA, S. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Italian children with gastroenteritis. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, n.11, p. 1025-1029, 2004.

DENNEHY, P.H.; NELSON, S.M.; SPANGENBERGER, S.; NOEL, J.S.; MONROE, S.S.; GLASS, R.I. A prospective case-control study of the role of astrovirus in acute diarrhea among hospitalized young children. **J. Infect. Dis.**, v. 184, p. 10-15, 2001.

EL-SENOUSY, W.M.; GUIX, S.; ABID, I.; PINTO, R.M.; BOSCH, A. Astrovirus removal from water and sewage treatment plants evaluated by a competitive RT-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, 2006.

ESPUL, A.; MARTINEZ, N.; NOEL, J.S.; CUELLO, H.; ABRILE, C.; GRUCCI, S.; GLASS, R.; BERKE, T.; MATSON, D.O. Prevalence and characterization of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. **J. Med. Virol.**, v. 72, p. 75-82, 2004.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. **Virus Taxonomy**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 859-864. Apresentado no Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, 8.

FODHA, I.; CHOUIKHA, A.; PEENZE, I.; DE BEER, M.; DEWAR, J.; GEYER, A.; MESSAADI, F.; TRABELSI, A.; BOUJAAFAR, N.; TAYLOR, M.B.; STEELE, D. Identification of viral agents causing diarrhea among children in the Eastern Center of Tunisia. **J. Med. Virol.**, v. 78, n. 9, p. 1198-1203, 2006.

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

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

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

GABBAY, Y.B.; LINHARES, A.C.; OLIVEIRA, D.S.; NAKAMURA, L.S.; MASCARENHAS, J.D.P.; GUSMÃO, R.H.P.; HEINEMANN, M.B.; MACÊDO, O.; LEITE, J.P.G. First detection of a human astrovirus type 8 in a child with diarrhea in Belém, Brazil: comparison with other strains worldwide and identification of possible three lineages. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, n. 4, p. 531-534, 2007.

GALDIERO, E.; MARINELLI, A.; PISCIOTTA, M.G.; PAGLIARA, I.; DI MONTEFORTE, E.S.; LIGUORI, G. Reverse transcriptase-PCR for the detection of astrovirus in children with nosocomial acute diarrhoea in Naples, Italy. **Med. Mal. Infect.**, v. 35, p. 213-217, 2005.

GALLIMORE, C.I.; TAYLOR, C.; GENNERY, A.R.; CANT, A.J.; GALLOWAY, A.; ITURRIZA-GOMARA, M.; GRAY, J.J. Environmental monitoring for gastroenteric viruses in a pediatric primary immunodeficiency unit. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 395-399, 2006.

GEIGENMÜLLER, U.; GINZTON, N.H.; MATSUI, S.M. Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. **J. Gen. Virol.**, v. 83, p. 1691-1696, 2002.

GIORDANO, M.O.; FERREYRA, L.J.; ISA, M.B.; MARTINEZ, L.C.; YUDOWSKY, S.I.; NATES, S.V. The epidemiology of acute viral gastroenteritis in hospitalized children in Cordoba city, Argentina: an insight of disease burden. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 43, n. 4, p. 193-197, 2001.

GLASS, R.I.; BRESEE, J.; JIANG, B.; GENTSCH, J.; ANDO, T.; FANKHAUSER, R.; NOEL, J.; PARASHAR, U.; ROSEN, B.; MONROE, S.S. Gastroenteritis viruses: an overview. In: **Gastroenteritis viruses**. Local: John Wiley & Sons, 2001. p. 5-25.

GUIX, S.; CABALLERO, S.; VILLENA, C.; BARTOLOMÉ, R.; LATORRE, C.; RABELLA, N.; SIMÓ, M.; BOSCH, A.; PINTÓ, R.M. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 133-139, 2002.

GUTIERREZ, M.F.; ALVARADO, M.V.; MARTINEZ, E.; AJAMI, N.J. Presence of viral proteins in drinkable water-Sufficient condition to consider water a vector of viral transmission? **Water Res.**, 2006.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/nt. **Nucl. Acids Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HERRMANN, J.E.; HUDSON, R.W.; PERRON-HENRY, D.M.; KURTZ, J.B.; BLACKLOW, N.R. Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus monoclonal antibodies. **J. Infect. Dis.**, v. 158, p. 182-185, 1988.

HERRMANN, J.E.; NOWAK, N.A.; PERRON-HENRY, D.M.; HUDSON, R.W.; CUBBIT, W.D.; BLACKLOW, N.R. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. **J. Infect. Dis.**, v. 161, p. 226-229, 1990.

HERRMANN, J.E.; TAYLOR, D.N.; ECHERRIA, P.; BLACKLOW, N.R. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, p. 1757-1760, 1991.

HILL-KING, L. Viral diarrhoea. **Biomed. Sci.**, p. 462-466, 2005.

JAASKELAINEN, A.J.; MAUNULA, L. Applicability of microarray technique for the detection of noro- and astrovirus. **J. Virol. Methods**, v. 136, n. 1-2, p. 210-216, 2006.

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.**, v. 74, p. 71-77, 2004.

JAKAB, F.; PÉTERFAI, J.; VEREBÉLY, T.; MELEG, E.; BÁNYAI, K.; MITCHELL, D.K.; SZÛCS, G. Human astrovirus infection associated with childhood intussusception. **Pediatr. Inter.**, v. 49, p. 103-105, 2007.

JIANG, B.; MONROE, S.S.; KOONIN, E.V.; STINE, S.E., GLASS, R.I. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshift signal that directs the viral replicase synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 10539-10543, 1993.

JONASSEN, C.M.; JONASSEN, T.O.; SAIF, Y.M.; SNODGRASS, D.R.; USHIJIMA, H.; SHIMIZU, M.; GRINDE, B. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. **J. Gen. Virol.**, v. 82, p. 1061-1067, 2001.

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

KING, C.K.; GLASS, R.; BRESEE, J.S. Managing acute gastroenteritis among children: oral rehydration, maintenance, and nutritional therapy. **MMWR**, v. 52, p. 1-16, 2003.

KLEIN, E.J.; BOSTER, D.R.; STAPP, J.R.; WELLS, J.G.; QIN, X.; CLAUSEN, C.R.; SWERDLOW, D.L.; BRADEN, C.R.; TARR, P.I. Diarrhea etiology in a Children's Hospital Emergency Department: a prospective cohort study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 7, p. 807-813, 2006.

KOCI, M.D.; MOSER, L.A.; KELLEY, L.A.; LARSEN, D.; BROWN, C.C.; SCULTZ-CHERRY, S. Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. **J. Virol.**, v. 77, n. 21, p. 11798-11808, 2003.

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

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infect. Dis.**, v. 6, p. 130, 2006.

KRISTON, S.; WILLCOCKS, M.M.; CARTER, M.J. Seroprevalence of astrovirus types 1 and 6 in London, determined using recombinant virus antigen. **Epidemiol. Infect.**, v. 117, p. 159-164, 1996.

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

KURTZ, J.B.; LEE, T.W. Human astrovirus serotypes. **Lancet**, v. 2, p. 1405, 1984.

LEE, T.W.; KURTZ, J.B. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. **J. Gen. Virol.**, v. 57, p. 421-424, 1981.

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

LEWIS, T.L.; GREENBERG, H.B.; HERRMANN, J.E.; SMITH, L.S.; MATSUI, S.M. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. **J. Virol.**, v. 68, p. 77-83, 1994.

LIU, C.; GRILLNER, L.; JONSSON, K.; LINDE, A.; SHEN, K.; LINDELL, AT.; WIRGART, B.Z.; JOHANSEN, K. Identification of viral agents associated with diarrhea in young children during a winter season in Beijing, China. **J. Clin. Virol.**, v. 35, p. 69-72, 2006.

LIU, M.Q.; YANG, B.F.; PENG, J.S.; ZHOU, D.J.; TANG, L.; WANG, B.; LIU, Y.; SUN, S.H.; HO, W.Z. Molecular epidemiology of astrovirus infection in infants in Wuhan, China. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1308-1309, 2007.

MADELEY, C.R.; COSGROVE, B.P. 28nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. **Lancet**, v. 1, p. 451-452, 1975.

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

MARSHALL, J.A.; BRUGGINK, L.D.; STURGE, K.; SUBASINGHE, N.; TAN, A.; HOGG, G.G. Molecular features of astrovirus associated with a gastroenteritis outbreak in an aged-care centre. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 26, p. 67-71, 2007.

MATSUI, S.M.; GREENBERG, H.B. Astroviruses. In: **Fields Virology**, edited by D.M. Knipe and P.M. Howley, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996, p. 811-824.

MATSUI, S.M.; GREENBERG, H.B. Astroviruses. In: **Fields Virology**, edited by D.M. Knipe and P.M. Howley, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p. 875-893.

MATSUI, S.M.; KIANG, D.; GINZTON, N.; CHEW, T.; GNIRKE, U.G. Molecular biology of astroviruses: selected highlights. In: **Gastroenteritis viruses**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2001, p. 219-236.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 5, p. 607-625, 1999.

MEDINA, S.M.; GUTIERREZ, M.F.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J.E. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, v. 8, p. 3481-3483, 2000.

MELEG, E.; JAKAB, F.; KOCSIS, B.; BANYAI, K.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. **J. Appl. Microbiol.**, v. 101, n. 5, p. 1123-1129, 2006.

MÉNDEZ, E.; ARIAS, C.F. Astroviruses. In: **Fields Virology**, edited by D.M. Knipe and P.M. Howley, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 981-1000.

MÉNDEZ, E.; SALAS-OCAMPO, M.P.E.; MUNGUÍA, M.E.; ARIAS, C.F. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. **J. Virol.**, v. 77, n. 21, p. 11378-11384, 2003.

MÉNDEZ, E.; SALAS-OCAMPO, E.; ARIAS, C.F. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. **J. Virol.**, v. 78, n. 16, p. 8601-8608, 2004.

MÉNDEZ-TOSS, M.; ROMERO-GUIDO, P.; MUNGUÍA, M.E.; MÉNDEZ, E.; ARIAS, C.F. Molecular analyses of a serotype 8 human astrovirus genome. **J. Gen. Virol.**, v. 81, p. 2891-2897, 2000.

MÉNDEZ-TOSS, M.; GRIFFIN, D.D.; CALVA, J.; CONTRERAS, J.F.; PUERTO, F.I.; MOTA, F.; GUISCAFRE, H.; CEDILLO, R.; MUNOZ, O.; HERRERA, I.; LOPEZ, S.; ARIAS, C.F. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 151-157, 2004.

MIDTHUN, K. et al. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 955-962, 1993.

MITCHELL, D.K. Astrovirus gastroenteritis. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 21, p. 1067-1069, 2002.

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

MONROE, S.S.; STINE, S.E.; GORELKIN, L. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. **J. Virol.**, v. 65, n. 2, p. 641-648, 1991.

MOSER, L.A.; SCHULTZ-CHERRY, S. Pathogenesis of astrovirus infection. **Viral Immunol.**, v. 18, n. 1, p. 4-10, 2005.

MUSTAFA, H.; PALOMBO, E.A.; BISHOP, R.F. Improved sensitivity of astrovirus-specific RT-PCR following culture of stool samples in CaCo-2 cells. **J. Clin. Virol.**, v. 11, p. 103-107, 1998.

MUSTAFA, H.; BISHOP, R.F.; PALOMBO, E.A. The biology and epidemiology of human astroviruses. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 12, p. 75-85, 2001.

NGUYEN, T.A.; YAGYU, F.; OKAME, M.; PHAN, T.G.; TRINH, Q.D.; YAN, H.; HOANG, K.T.; CAO, A.T.H.; HOANG, P.L.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh City, Vietnam. **J. Med. Virol.**, v. 79, p. 582-590, 2007.

NOEL, J.S.; LEE, T.W.; KURTZ, J.B.; GLASS, R.I.; MONROE, S.S. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 797-801, 1995.

OLESEN, B.; NEIMANN, J.; BÖTTIGER, B.; ETHELBERG, S.; SCHIELLERUP, P.; JENSEN, C.; HELMS, M.; SCHEUTZ, F.; OLSEN, K.E.P.; KROGFELT, K.; PETERSEN, E.; MOLBAK, K.; GERNER-SMIDT, P. Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 8, p. 3636-3641, 2005.

PAZDIORA, P.; JELINKOVA, H.; SVECOVA, M.; TABORSKA, J. First experience with diagnosing astroviral infections in children hospitalized in Pilsen (Czechia). **Folia Microbiol., Praha**, v. 51, n. 2, p. 129-132, 2006.

PHAN, T.G.; OKAME, M.; NGUYEN, T.A.; MANEEKARN, N.; NISHIO, O.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. **J. Med. Virol.**, v. 73, n. 2, p. 256-261, 2004.

RISCO, C.; CARRASCOSA, J.L.; PEDREGOSA, A.M. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. **J. Gen. Virol.**, v. 76, p. 2075-2080, 1995. Part. 8.

RODRIGUEZ-BAEZ, N.; O'BRIAN, R.; QIU, S.Q.; BASS, D.M. Astrovirus, adenovirus and rotavirus in hospitalized children: prevalence and association with gastroenteritis. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 35, p. 64-68, 2002.

ROHAYEM, J.; BERGER, S.; JURETZEK, T.; HERCHENRÖDER, O.; MOGEL, M.; POPPE, M.; HENKER, J.; RETHWILM, A. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. **J. Virol. Methods.**, v. 118, p. 49-59, 2004.

ROMÁN, E.; WILHELMI, I.; COLOMINA, J.; VILLAR, J.; CILLERUELO, M.L.; NEBREDA, V.; ALAMO, M.D.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Acute viral gastroenteritis: proportion and clinical relevance of multiple infections in Spanish children. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 435-440, 2003.

ROSENFELDT, V.; VESIKARI, T.; PANG, X.L.; ZENG, S.Q.; TVEDE, M.; PAERREGAARD, A. Viral etiology and incidence of acute gastroenteritis in young children attending day-care centers. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 24, n. 11, p. 962-965, 2005.

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

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

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

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

SEBIRE, N.J.; MALONE, M.; SHAH, N. Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. **J. Clin. Pathol.**, v. 57, n. 9, p. 1001-1003, 2004.

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

SILVA, P.A. **Caracterização molecular de astrovírus provenientes de amostras fecais de crianças da região centro-oeste do Brasil.** 58 f. Dissertação (Doutorado em Medicina Tropical) – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

SILVA, P.A.; CARDOSO, D.D.P.; SCHREIER. Molecular characterization of human astroviruses isolated in Brazil, including the complete sequences of astrovirus genotypes 4 and 5. **Arch. Virol.**, 2006.

SMITH, A.; REACHER, M.; SMERDON, W.; ADAK, G.K.; NICHOLS, G.; CHALMERS, R.M. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Epidemiol. Infect.**, v. 134, n. 6, p. 1141-1149, 2006.

TANAKA, H.; KISIELIUS, J.J.; UEDA, M.; GLASS, R.I.; JOAZEIRO, P.P. Intrafamilial outbreak of astrovirus gastroenteritis in São Paulo, Brazil. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v. 12, n. 3, p. 219-221, 1994.

THORNTON, A.C.; JENNINGS-CONKLIN, K.S.; MCCORMICK, M.J. Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. **Disaster Manag. Response**, v. 2, p. 4-9, 2004.

TRAORÉ, O.; BELLIOU, G.; MOLLAT, C.; PILOQUET, H.; CHAMOIX, C.; LAVERAN, H.; MONROE, S.S.; BILLAUDEL, S. RT-PCR identification and typing of astroviruses and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections. **J. Clin. Virol.**, v. 17, p. 151-158, 2000.

TREVINO, M.; PRIETO, E.; PENALVER, D.; AGUILERA, A.; GARCIA-ZABARTE, A.; GARCIA-RIESTRA, C.; REGUEIRO, B.J. Diarrhea caused by adenovirus and astrovirus in hospitalized immunodeficient patients. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 19, n. 1, p. 7-10, 2001.

TUCKER, A.W.; HADDIX, A.C.; BRESEE, J.S. Cost-effectiveness analysis of a rotavirus immunization program for the United States. **JAMA**, v. 279, p. 1371-1376, 1998.

VAN REGENMORTEL, C.M.; FAUQUET, D.H.L.; BISHOP, E.B.; CARSTENS, M.K.; ESTES, S.M.; LEMON, J.; MANILOFF, M.A.; MAYO, D.J.; Mc GEOCH, C.R.; PRINGLE, R.B.; WICKNER. **Virus Taxonomy**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2000. p. 741-745. Apresentado no Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, 6.

VERNACCHIO, L.; VEZINA, R.M.; MITCHELL, A.A.; LESKO, S.M.; PLAUT, A.G.; ACHESON, D.W. Diarrhea in American infants and young children in the community setting: incidence, clinical presentation and microbiology. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, n. 1, p. 2-7, 2006.

VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F.A.; HEINEMANN, M.B.; LEITE, J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P. Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Virol.**, v. 79, p. 939-944, 2007.

WALTER, J.E.; MITCHELL, D.K.; GUERRERO, M.L.; BERKE, T.; MATSON, D.O.; MONROE, S.S.; PICKERING, L.K.; RUIZ-PALACIOS, G. Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico City. **J. Infect. Dis.**, v. 183, n. 5, p. 681-686, 2001.

WEBB, A.; STARR, M. Acute gastroenteritis in children. **Aust. Fam. Physician**, v. 34, p. 227-231, 2005.

WILLCOCKS, M.M.; BROWN, T.D.; MADELEY, C.R.; CARTER, M.J. The complete sequence of a human astrovirus. **J. Gen. Virol.**, v. 7, p. 1785-1788, 1994.

YE, X.H.; JIN, Y.; FANG, Z.Y.; SUN, Y.P.; XIE, H.P.; ZHANG, Q.; XI, J.; STEELE, D.; GLASS, R. Etiological study on viral diarrhea among children in Lanzhou, Gansu, from July 2004 through June 2005. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.**, v. 27, n. 2, p. 117-122, 2006.

ZHANG, Z.; MITCHELL, D.K.; AFFLERBACH, C.; JAKAB, F.; WALTER, J.; ZHANG, Y.J.; STAAT, M.A.; AZIMI, P.; MATSON, D.O. Quantitation of human astrovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction to examine correlation with clinical illness. **J. Virol. Methods**, v. 134, n. 1-2, p. 190-196, 2006.