



REVISÃO

Enterovírus como indicadores de qualidade da água

Juliana Comerlato¹, Lucas Kessler de Oliveira², Fernando Rosado Spilki^{3*}

Recebido: 17 de maio de 2010 Recebido após revisão: 15 de outubro de 2010 Aceito: 22 de outubro de 2010
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1593>

RESUMO: (Enterovírus como indicadores de qualidade da água). Os enterovírus fazem parte do grupo dos vírus entéricos, constituído de importantes patógenos, isolados com frequência de águas contaminadas por poluição fecal. Recebem essa classificação principalmente por suas características de replicação no trato intestinal do hospedeiro e transmissão pela via fecal-oral. Esse grupo de vírus resiste a altas concentrações de diferentes compostos clorados, apresentando, assim, resistência aos tratamentos habituais da água. Atualmente, o principal parâmetro utilizado para controle microbiológico da água são os coliformes fecais. Caso esses coliformes estejam presentes, deve-se evitar o consumo humano da água analisada. Porém, diversos autores têm discutido a presença de enterovírus em amostra de águas mesmo na ausência de coliformes, o que parece desnecessar essas bactérias como confiáveis marcadores de poluição fecal. Além disso, dentre os patógenos veiculados pela água, a presença de enterovírus é considerada pela OMS como sendo um indicio de contaminação fecal e relacionada a epidemias de doenças de veiculação hídrica. Este fato é exacerbado por serem os enterovírus frequentes causadores de doenças habituais, tais como diarreias e conjuntivites, assim como doenças mais graves, incluindo meningoencefalites.

PALAVRAS-CHAVE: enterovírus, bioindicador, análise virológica da água.

ABSTRACT: (Enteroviruses as indicators of water quality). Enteroviruses belong to enteric virus group, which is composed by pathogens often isolated from water contaminated with fecal pollution. They receive this classification mainly due to their ability to replicate in the host's gut and be transmitted through the fecal-oral route. This group of virus resist to high concentrations of chlorine, showing resistance to the usual protocols for treatment of water. Monitoring of fecal pollution in water is usually performed through the detection and quantification of fecal coliforms. When coliforms are present, it is recommendable to avoid the human consumption of water. However, several authors reported the presence of enteric viruses in water samples that are free of coliforms, this fact might indicate that this bacterial parameter is a non reliable indicator of fecal pollution. Besides, among the pathogens transmitted by water, the presence of enteroviruses is considered by WHO a reliable indicator of fecal contamination and related with epidemic diseases transmitted by water. This fact is exacerbated due the frequency of enterovirus causing habitual diseases, such as diarrhea and conjunctivitis, as well as more severe diseases, including meningitis and encephalitis.

KEY WORDS: enterovirus, bioindicator, viral analysis of water.

HISTÓRICO

Os enterovírus pertencem à mesma família (*Picornaviridae*) que inclui o primeiro vírus animal descrito, o vírus da Febre Aftosa (FMDV), nos trabalhos pioneiros de Loeffler & Frösch, em 1897. À semelhança do FMDV, a família também alberga vírus de grande destaque, tais como os Poliovírus, que de forma similar possui elevada capacidade de transmissão e é alvo de campanha de erradicação através de vacinas. Landsteiner e Popper, em 1908, conseguiram transmitir poliomielite entre primatas não-humanos utilizando um filtrado, mostrando assim que a doença seria causada por um agente filtrável. Depois, observou-se que três diferentes sorotipos de poliovírus existiam, já que um único antissoro não se mostrava eficiente para neutralizar a infectividade de todas as amostras estudadas (Hyypia *et al.* 1997). Esses foram os primeiros vírus a serem inoculados e propagados em cultivos celulares *in vitro*, já no ano de 1949 (Enders *et al.* 1949), um marco na história da virologia.

Este avanço metodológico conduziu ao desenvolvimento posterior de vacinas inativadas contra poliomielite por Salk, em 1953, e vacinas atenuadas, por Sabin, em 1955 (Salk 1953, Sabin 1955). Essas vacinas têm-se mostrado relativamente seguras e efetivas ao logo dos anos (Hyypia *et al.* 1997), todavia, os riscos de reversão à virulência e deste modo a impossibilidade de remover a vacinação em médio prazo, tem sido um obstáculo à erradicação da enfermidade. Além disso, dada a excreção do vírus vacinal, a vigilância de sua disseminação no ambiente também deve ser uma meta para os próximos anos.

Enquanto isso, Dalldorf e Sickles, em 1948, isolaram um novo vírus a partir de amostras clínicas de duas crianças com casos suspeitos de poliomielite. Estes patógenos induziam paralisia em ratos recém-nascidos (Dalldorf & Sickles 1948), em contraste com os poliovírus previamente descritos, os quais normalmente causavam doença apenas em primatas. Esse novo vírus foi chamado de Coxsackievírus e mais tarde de vírus Coxsackie A (CAV)

1. Graduanda em Biomedicina. Laboratório de Microbiologia Molecular, Universidade Feevale. Novo Hamburgo, RS, Brasil.

2. Mestrando em Qualidade Ambiental, Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental, Laboratório de Microbiologia Molecular, Universidade Feevale. Novo Hamburgo, RS, Brasil.

3. Professor Adjunto e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental, Universidade Feevale. Novo Hamburgo, RS, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: fernandors@feevale.br

(Hyypia *et al.* 1997). O CAV induzia a uma paralisia flácida, diferindo da paralisia espasmódica, observada depois da inoculação de filtrados de outros enterovírus em ratos. Hoje, sabe-se que este último agente é o vírus Coxsackie B (CBV) (Hyypia *et al.* 1997).

No final dos anos 50, foram identificados ainda vírus semelhantes em animais domésticos, especialmente em suínos e bovinos. Foram descritos pelo menos treze sorotipos de enterovírus suínos (PEV) (Knowles *et al.* 1979, Honda *et al.* 1990, Auerbach *et al.* 1994) e dois sorotipos de enterovírus bovinos (BEV) (Knowles & Barnett 1985, Urakawa & Shingu 1987). Enterovírus isolados de outros animais como ovelhas, cabras, veados e outros mostraram estar relacionados ao BEV-1 (Hamblin *et al.* 1985, Sharma *et al.* 1986, Urakawa & Shingu 1987). Mais recentemente, foi observado, em suínos, um novo agente desta família, denominado *Teschovirus* (Larry & Lutwick 2006).

O surgimento das técnicas de cultivo celular permitiu, em 1949, isolar enterovírus que não se replicavam em animais experimentalmente inoculados. Esse é o caso do *Echovirus*, que foi isolado de amostras onde o *Poliovirus* e os *Coxsackievirus* normalmente eram encontrados. Todavia, não se denotava patogenicidade para esse grupo viral em experimentos animais. Os *Echovirus* não estavam relacionados a nenhuma doença até 1955, daí seu nome, onde ECHO é a sigla em inglês para Entérico, Citopatogênico, Humano e Órfão, por não estarem associados a doenças (Committee On The Echo Viruses 1955). Atualmente *Echovirus* tem predominado, no gênero de enterovírus, como causador de epidemias de meningite asséptica. Recentemente tal surto foi relatado na Sérvia, onde em Junho e Julho de 2010 houve 80 casos de meningite asséptica, sendo a espécie isolada o *Echovirus 30* (Ćosić *et al.* 2010). Outro estudo que demonstrou a relação deste vírus com casos de meningite asséptica foi realizado durante o ano de 2005, no Rio de Janeiro, Brasil. Neste, em 22 pacientes, foi confirmada infecção pela mesma espécie de echovírus descrita anteriormente (Pinto Junior *et al.* 2009). A maioria das infecções relacionadas com esta espécie de echovírus predomina na faixa etária de 1 a 15 anos (Ćosić *et al.* 2010, Pinto Junior *et al.* 2009).

De 1970 a 2005, foram detectados 52.812 isolados de enterovírus não-poliovírus, registrados pelo CDC. Os 15 enterovírus reportados mais comuns se enquadram filogeneticamente em 83,5% dos enterovírus de sorotipos previamente conhecidos (Khetsuriani *et al.* 2006).

CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E MOLECULARES

Enterovírus são vírus dotados de genoma de cadeia única de RNA com polaridade positiva. Seus vírions são não-envelopados, com um capsídeo icosaédrico, o qual mede entre 27 e 30 nm de diâmetro. Sua cadeia de RNA é composta por aproximadamente 7,5 mil bases, com apenas uma janela aberta de leitura funcional, a qual

codifica um polipeptídeo que dá origem a proteínas virais, flanqueada por regiões não traduzidas (UTR) localizadas nas extremidades 5' e 3'. O processamento proteolítico co- e pós- transcricional dá origem a três precursores, nomeados P1 a P3. Estes produtos são secundariamente clivados nas 4 proteínas estruturais (nominadas VP1 a VP4). As proteínas estruturais, presentes no capsídeo, são agrupadas para formar os vírions, associadas às proteínas não estruturais (Racaniello 2007). As três primeiras, VP1-VP3, são encontradas na superfície do vírion, enquanto a VP4 fica internalizada (Nasri, *et al.* 2007).

A replicação do RNA dos enterovírus ocorre no citoplasma (Sinha *et al.* 2006), sendo mediada por um complexo aderido à membrana, onde interagem as enzimas virais vírus-RNA-dependente, RNA polimerase e muitas proteínas virais e celulares. (Racaniello 2007, Yin *et al.* 2007, Sean & Semler 2008).

TAXONOMIA

Os enterovírus pertencem à ordem *Picornavirales*, família *Picornaviridae*, atualmente dividida em doze gêneros: *Aphthovirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Parechovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* e *Tremovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV 2009). O gênero enterovírus foi inicialmente dividido por análises genômicas, antigênicas e de patogenicidade em subgrupos, tais como: poliovírus, coxsackievírus, echovírus, os enterovírus numerados e teschovírus (Hyypia, *et al.* 1997). Por esse motivo, alguns vírus receberam somente um número para identificação até que mais informações estivessem disponíveis. Um exemplo disso é o vírus da hepatite A que, inicialmente, foi classificado como enterovírus 72, sendo, após, reclassificado no gênero *Hepatovirus* da família *Picornaviridae* (Hyypia *et al.* 1997).

A dificuldade de classificação dos enterovírus causou diversas modificações na sua taxonomia nos últimos anos. Dentro dos fatores responsáveis estão as variações na sua patogenicidade, que são causadas pelas diferenças na estrutura molecular das proteínas virais (Hyypia *et al.* 1997). Portanto, atualmente, a classificação proposta pelo ICTV divide esse gênero em dez subgrupos, sendo sete deles presentes em seres humanos: Rinovírus humano A, B e C e enterovírus humano de A a D, enquanto três são típicos de animais: enterovírus bovino, enterovírus de símio A e enterovírus suíno B (ICTV 2009). Nesta nova classificação o poliovírus, que anteriormente formava um subgrupo, foi reclassificado no grupo enterovírus humano C (Leitch *et al.* 2009).

Dentro dos subgrupos de enterovírus humano, estão mais de 100 sorotipos causadores de doenças (Fauquet 2005), sendo que o subgrupo A compreende entre tantos os *Coxsackievirus* A2-A8, A10, A12, A14, A16 e *Enterovirus* 71, o subgrupo B, *Coxsackievirus* A9 e B1-B6, *Echovirus* 1-7, 9, 11-21, 24-27, e 29-33 e *Enterovirus* 69, o subgrupo C, *Coxsackievirus* A1, A11, A13, A15, A17-22, e A24, e o subgrupo D, enterovírus 68 e 70 (King *et al.*

al. 2000, Belguith *et al.* 2007). Essas classificações têm se baseado em propriedades biológicas e estruturais dos enterovírus (Khetsuriani *et al.* 2006).

EPIDEMIOLOGIA

Os enterovírus se multiplicam no trato gastrointestinal dos indivíduos infectados, o que favorece a excreção destes em altas concentrações pelas fezes (Abbaszadegan 2001). Deste modo a transmissão de enterovírus se dá principalmente pela rota fecal-oral e oral-oral, mas também através de contato direto com secreções oftálmicas e lesões de dermatites (Lee & Jeong 2004). A média do tempo de incubação varia entre três e dez dias (Sinha *et al.* 2006).

Por suas características de transmissão, os enterovírus fazem parte do grande grupo dos chamados vírus entéricos. Esse grupo é constituído de importantes patógenos encontrados com frequência em águas contaminadas por poluição fecal (Fong & Lipp 2005). Esta contaminação pode ser dada diretamente por matéria fecal, vômito ou indiretamente pela exposição a superfícies contaminadas (Fiore 2004, Lamhoujeb 2008, Kovac 2009). Enterovírus têm sido isolados em vários tipos de águas superficiais e subterrâneas, como marinha, rio, esgoto, água fresca, poços e até mesmo, e mais importante para o ponto de vista epidemiológico, água considerada potável, pós-tratamento convencional (Fong & Lipp 2005).

Além de apresentarem resistência aos métodos habituais de tratamento da água, esses microrganismos permanecem viáveis mesmo em grandes mudanças de temperatura (Gregory & Litaker, Noble 2006, Sinha *et al.* 2006). Para inativar 90% de poliovírus presentes em água salgada são necessários 671 dias à temperatura de 4°C, já à temperatura de 25°C esse tempo se reduz para 25 dias. Em comparação, caso expostos por 24 horas à luz solar, 99,9% dos poliovírus serão inativados (Johnson *et al.* 1997, Wetz *et al.* 2004). Essas propriedades físico-químicas permitem que tais vírus permaneçam viáveis no ambiente aquático por longos períodos, podendo ainda ser encontrados em alimentos e solo regados por água contaminada (Lee & Jeong 2004).

Outro fator que beneficia a distribuição dos enterovírus e de outros vírus entéricos é sua alta infectividade. Quando comparados com bactérias, o risco de infecção viral por administração de água contaminada é de 10 a 10.000 vezes maior que o risco de infecção bacteriana se beber água com quantidade similar de bactérias ou vírus de origem fecal (Haas *et al.* 1993, Fong & Lipp 2005).

Uma característica epidemiológica curiosa é o fato dos enterovírus apresentarem seu pico de novas infecções no verão, diminuindo o número de indivíduos afetados logo após. Esse aumento de intensidade das infecções no verão pode ser atribuído ao aumento das atividades recreativas na água, por força da estação, e ao aumento da ingestão de água também em virtude das temperaturas elevadas e maior necessidade de reposição hídrica (Kocwa-Haluch 2001, Sedmak *et al.* 2003, Hsu *et al.* 2009). Além dis-

so, um real aumento das concentrações de enterovírus durante o verão, como observado em águas analisadas pelo período de um ano na Tunísia (Belguith *et al.* 2007), causado por variações climáticas sazonais, em especial aumentos nos índices pluviométricos, pode influenciar o grande número de casos de infecções no verão.

DOENÇAS CAUSADAS POR ENTEROVÍRUS EM SERES HUMANOS

As infecções por enterovírus representam a causa mais frequente de resfriados. Além disto, eles são importantes causadores de gastroenterites, e entre outras doenças, principalmente a poliomielite. Todavia, provavelmente, a maior parte das infecções ocorre de forma subclínica, pois dados apontam que nos Estados Unidos ocorrem, de 30 a 50 milhões de novas infecções por enterovírus anualmente, sendo que dessas apenas 5 a 15 milhões são sintomáticas (Gregory & Litaker, Noble 2006).

A sintomatologia dessas infecções é caracterizada pela alta heterogeneidade de manifestações clínicas (Bernit *et al.* 2004). Cada subgrupo, dentro desse gênero, apresenta peculiaridades sintomatológicas diferenciadas (Fong & Lipp 2005). E mesmo que sejam majoritariamente transmitidas pela via fecal-oral, achados clínicos mostram que além de causar gastroenterites, alguns desses vírus invadem outros órgãos a partir do trato intestinal causando, então, infecções respiratórias, erupção cutânea, infecções generalizadas em recém-nascidos e envolvimento do sistema nervoso central variando de uma meningite moderada a casos fatais de encefalite e paralisia (Hyypia *et al.* 1997).

Na maioria dos casos de infecções por enterovírus, há grande dificuldade de estabelecer um diagnóstico preciso baseado apenas nos sintomas clínicos, já que muitas outras famílias de vírus devem ser consideradas além dos diferentes enterovírus reconhecidos (Hyypia *et al.* 1997).

Poliovírus

O subgrupo poliovírus normalmente infecta o hospedeiro atingindo o sistema nervoso central, podendo causar a poliomielite, que historicamente era a principal doença causada por enterovírus em seres humanos (Fong & Lipp 2005), hoje erradicada no Brasil e em vias de erradicação mundialmente (Schatzmayer & Filipis, Friederich 2002).

A enfermidade é causada quase invariavelmente por um dos três sorotipos de poliovírus (Hyypia *et al.* 1997), embora já tenham sido relatados casos esporádicos de doenças paralíticas causadas por outros enterovírus, tais como o coxsackievírus. A ocorrência de paralisia flácida aguda (AFP) causada por enterovírus não-poliovírus (NPEV) é freqüente em países onde a cobertura vacinal visando erradicação global do poliovírus ainda é baixa. Em estudo realizado na Índia, 32,3% dos casos de AFP causadas por NPEV eram pelo coxsackievírus, e em seguida o echovirus (Dhole *et al.* 2009).

Dentre os três diferentes sorotipos de poliovírus, o tipo 1 e 3 são reconhecidos como epidêmicos, enquanto

o tipo 2 é endêmico (Kmetzsch *et al.* 2006). Via de regra, o tipo 1 é responsável pela infecção que causa a forma severa de paralisia (Kmetzsch *et al.* 2006). Entretanto, a forma clínica da poliomielite é uma consequência de apenas uma pequena minoria das infecções, ocorrendo talvez em apenas de 0,1 a 1% dos casos de infecções (Hyypia *et al.* 1997).

Uma variante do poliovírus selvagem, o poliovírus derivado da vacina (VDPV) é outro agente causador da AFP (Kew *et al.* 2005) e, apesar da poliomielite de origem selvagem ter sido erradicada do continente americano, casos de AFP, pelo VDPV, continuam a acontecer em virtude de falhas de cobertura vacinal, ou ainda pela visita de estrangeiros oriundos de países onde a cobertura vacinal é precária (Dias *et al.* 2009). Poliovírus também podem causar meningite asséptica ou doenças secundárias não específicas, enquanto a maioria das infecções é assintomática (Hyypia *et al.* 1997).

Coxsackievírus

Os coxsackievírus têm sido associados não apenas a infecções no sistema respiratório, AFP e gastroenterites, mas também a diabetes insulino-dependente e doenças cardíacas como pericardite e miocardite (Kocwa-Hauluch 2001).

Os coxsackievírus são usualmente classificados em dois grandes grupos, A e B. O grupo A inclui 24 tipos sorológicos, enquanto o grupo B compreende seis sorotipos (Khetsuriani *et al.* 2006). De acordo com o grupo, diferentes sintomas de doenças são induzidos. O grupo A demonstra um forte tropismo pelo tecido muscular esquelético e cardíaco, enquanto o B tem mais tropismo pelo tecido cerebral, fígado, pâncreas exócrino e tecido adiposo multinocular (gordura marrom), e causa necrose em órgãos parenquimais (Hyypia *et al.* 1997, Rajtar *et al.* 2008).

Os coxsackievírus também podem estar relacionados a outras manifestações clínicas de ordem mais rara ou de frequência desconhecida em nosso meio: meningite, encefalite asséptica, paralisia flácida (grupo A), paralisia espasmódica (grupo B), conjuntivite hemorrágica, herpangina, pleurodinia epidêmica - Doença de Bornholm, exantema difuso e erupções cutâneas (Sinha *et al.* 2006). Em especial o coxsackievírus B4, (antigo echovírus 22) tem sido encontrado associado com alto risco de morte (Khetsuriani *et al.* 2006).

Echovírus e enterovírus numerados

O subgrupo echovírus é geralmente menos infeccioso que outros enterovírus e está associado a resfriados comuns e doenças respiratórias (Kocwa-Hauluch 2001). Outros autores sugerem também que esse vírus não esteja relacionado com um amplo espectro de manifestações clínicas (Hyypia *et al.* 1997). Todavia, alguns sorotipos já tem sido identificados como causadores de doenças específicas, assim como o echovírus 9 e 30, frequentemente associados com meningite asséptica e o echovírus

11, como causador de infecções sistêmicas fatais em neonatos (Kiang *et al.* 2009).

Já os enterovírus numerados enterovírus tipo 68 a 71 têm sido isolados de pacientes com bronquiolite, conjuntivite, meningite e paralisia, a qual se assemelha à poliomielite (Kocwa-Hauluch 2001). Além destas manifestações o enterovírus 71 pode também causar doenças neurológicas severas como a meningite asséptica, paralisia e encefalite bulbar (Khetsuriani *et al.* 2006).

Diabetes tipo 1 e Enterovírus

A capacidade dos enterovírus infectarem o pâncreas humano é conhecida de longa data (Yoon *et al.* 1979). Porém, ainda não é clara a relação que isso tem com a diabetes insulino-dependente, diabetes do tipo 1 (DM1, Roivainen 2006). O mecanismo de patogenia mais provável parece relacionado ao desencadeamento de respostas de autoimunidade.

Em estudo realizado por Sarmiento *et al.* (2007) coelhos foram imunizados com os sorotipos de enterovírus mais frequentes e, em sequência, analisou-se a presença de três auto-antígenos das células das ilhotas de humanos. A análise demonstrou a presença de anticorpos contra antígenos da enzima pancreática ácido glutâmico-descarboxilase (GAD) nos soros dos coelhos imunizados com enterovírus. Quanto aos coelhos controle negativo, não foi detectada a presença de nenhum dos três anticorpos. Esses resultados parecem sugerir a existência de determinantes antigênicos comuns entre sorotipos de enterovírus e auto-antígeno GAD de células Beta humanas (Sarmiento *et al.* 2007). Foi demonstrado também que o enterovírus possui tropismo *in vitro* e *in vivo* pelas células das ilhotas humanas (Ylipaasto *et al.* 2004).

Outro estudo que realizou análise post-mortem de pâncreas de pacientes com DM1, utilizando hibridização *in situ*, revelou a presença de RNA de enterovírus exclusivamente nas ilhotas (Ylipaasto *et al.* 2004).

Doenças causadas por enterovírus em outros animais

Além de o enterovírus ser isolado de seres humanos, sua ocorrência em animais tem sido evidenciada e muitas vezes associada a enfermidades. Os enterovírus foram investigados em animais domésticos variados e detectados com frequência em suínos e bovinos. Enterovírus também foram isolados de outros ruminantes, tais como ovelhas, cabras e veados, sendo que estes normalmente são relacionados filogeneticamente ao enterovírus bovino (Hamblin & Knowles, Hedger, 1985, Sharma *et al.* 1986, Urakawa & Shingu, 1987). Em outros estudos, vírus deste gênero foram encontrados também em aves (McNulty *et al.* 1984, Spackman *et al.* 1984, McNulty *et al.* 1987, Decaesstecker, 1989, Mcneilly *et al.* 1994). Doenças como infertilidade, distúrbios respiratórios e diarreia têm sido diagnosticadas em animais como possível efeito da infecção por enterovírus (Hyypia *et al.* 1997).

ENTEROVÍRUS EM BOVINOS

O enterovírus bovino (BEV) é endêmico em bovinos

e a infecção normalmente é assintomática (Goens *et al.* 2004, McCarthy *et al.* 1999), ainda que possam ocorrer esporadicamente manifestações clínicas entéricas ou respiratórias (Blas-Machado *et al.* 2007). Diversos estudos têm isolado enterovírus bovino de fezes de animais com sintomas de pneumonia, doenças respiratórias, enterites, disenteria, e desordens de fertilidade, além do BEV ter sido também isolado de soro fetal de abortos e mais frequentemente de fezes de animais saudáveis (Zell *et al.* 2006). Esse enterovírus é excretado em grandes quantidades nas fezes dos animais, o que permite sua disseminação aos mananciais de água das propriedades rurais e até mesmo a infecção de ruminantes silvestres, portanto, tendo um potencial impacto ambiental direto sobre a fauna (Jimenez-Clavero *et al.* 2005, Gur *et al.* 2008).

ENTEROVÍRUS EM SUÍNOS

Dois sorotipos de enterovírus têm sido descritos como agentes causadores de importantes doenças em suínos. A Polioencefalomielite suína, doença de Teschen, ou poliomielite Porcina, é causada pela infecção pelo enterovírus PEV-1, conhecido desde 1930 (Zhang *et al.* 1993, Hyypia *et al.* 1997). Outra enfermidade relevante é a doença vesicular dos suínos, causada pelo SVD, cujo agente foi identificado inicialmente em 1966 (Hyypia *et al.* 1997), sendo este último um variante do enterovírus humano CBV-5 (Zhang *et al.* 1993).

O Teschovírus suíno, ainda que pertencente a outro gênero da mesma família dos enterovírus, geralmente induz uma infecção inaparente e não tem manifestações clínicas evidentes (Kaku *et al.* 2001). Apesar disso, este vírus pode estar associado a um transtorno neurológico conhecido como doença de Teschen-Talfan (Harding *et al.* 1957). Este vírus, anteriormente classificado como enterovírus devido à grande semelhança existente entre ambos, principalmente nas propriedades físico-químicas, compreende onze sorotipos, e a análise de suas sequências nucleotídicas levou à reclassificação das mesmas em um novo gênero, denominado *Teschovirus*, conforme mencionado anteriormente, também pertencente à família *Picornaviridae* (Kaku *et al.* 1999, Kaku *et al.* 2001, Zell *et al.* 2001, Krumbholz *et al.* 2002).

ENTEROVÍRUS EM AVES

Até o ano de 1983, apenas dois vírus encontrados em galinhas haviam sido classificados como enterovírus: o vírus da Encefalomielite aviária (AEV) e o vírus da Nefrite aviária (ANV) (Smyth *et al.* 2007). Após, vários relatos de enterovírus associados a enfermidades em aves vêm sendo publicados (McNulty *et al.* 1984, 1987, Spackman *et al.* 1984, Decaesstecker *et al.* 1989, Mcneilly *et al.* 1994).

A análise das características biológicas do AEV e do ANV revelou que eles pertencem a seis diferentes sorogrupos (McNulty *et al.* 1990, Mcneilly *et al.* 1994). Mais tarde, com base em análises genômicas, o AEV foi classi-

ficado como um *Hepatovirus* da família *Picornaviridae* (Fauquet *et al.* 2005), enquanto o ANV foi reclassificado como um *Avastrovirus* da família *Astroviridae* (Monroe *et al.* 2005).

Os isolados descritos FP3 (McNulty *et al.* 1990) e 612 (Mcneilly *et al.* 1994) representam dois outros sorogrupos distintos de enterovírus em aves. Eles são antigenicamente diferentes de AEV e ANV e, na ausência de informação genômica, permanecem sem uma classificação definida.

ENTEROVÍRUS SÍMIO

Há poucos estudos associando infecção por enterovírus símio com doenças específicas em primatas (Kalter, 1982). Lesões menores do sistema nervoso central têm sido reportadas em infecções experimentais em animais (Kalter, 1982), porém a maioria dos enterovírus símios é isolada de material proveniente de animais saudáveis (Hull *et al.* 1958, Hoffert *et al.* 1958, Malherbe & Harwin, 1963, Heberling & Cheever, 1965).

Os sorotipos SV4 e SV6 foram identificados pela observação acidental do efeito citopatogênico (CPE) em células normais de rim de macaco que foram preparadas para produção de vacina de poliomielite (Hull *et al.* 1956). De outro lado, SV6 e SV19 têm sido também isolados de macacos com gastroenterite aguda, porém sem associação clara entre infecção por estes agentes e a doença (Hoffert *et al.* 1958). Assim como a vasta maioria das infecções por enterovírus em humanos são assintomáticas, o mesmo parece ser verdadeiro para as enterovirose de símios (Nix *et al.* 2008).

DETECÇÃO DE ENTEROVÍRUS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Devido à estabilidade dos vírions desse gênero no meio ambiente, em virtude de sua estrutura não-envelopada, diversos estudos têm sido conduzidos para demonstrar a presença de enterovírus em águas de diversas origens (Rajtar *et al.* 2008). O estímulo a essa busca deve-se, principalmente, ao fato de esses vírus representarem um risco de saúde pública devido à sua facilidade de disseminação pelas águas contaminadas, transmissão via fecal-oral, e à facilidade que apresentam em causar infecções em humanos, mesmo quando em baixo número de partículas infecciosas presentes (Carter 2005).

Atualmente, no Brasil, o Ministério da Saúde, pela portaria 518/2004, considera como água potável, pelo parâmetro microbiológico, a ausência de coliformes fecais, os quais são usados, então, como os únicos bioindicadores de contaminação microbiológica. Caso esses coliformes estejam presentes, deve-se excluir o consumo humano desta água, conforme uma tabela de adequação levando em conta a demanda atendida. (Brasil 2004). Porém, tem-se observado a presença de vírus entérico em amostras de águas ausentes de coliformes (Locas *et al.* 2007), o que pode comprometer os ensaios laboratoriais

baseados na detecção de tais bactérias como marcadores confiáveis de poluição fecal. Além disso, dentre os patógenos veiculados pela água, a presença do enterovírus é considerada pela OMS como sendo de alta severidade e possível de causar epidemias (WHO 2006), ainda mais pelo fato de ser um frequente causador de doenças habituais, assim como doenças mais graves, além de apresentar alta infectividade (Gregory *et al.* 2006, WHO 2006). Outro aspecto importantíssimo de se fazerem esforços no sentido de detectar enterovírus, em especial poliovírus no ambiente, é que a vigilância ambiental deste agente constitui um dos pilares para erradicação do vírus em nível mundial (WHO 2003).

Em estudo conduzido por Lodder & De Roda Husman (2005), foi demonstrado que, no rio Maas (Holanda), onde o esgoto é despejado, foram encontradas partículas de enterovírus em altas concentrações. Achados semelhantes foram relatados em Minsk (Bielo-Rússia), em 2003. A fonte de contaminação foi estabelecida como sendo água contaminada por esgoto, contendo principalmente ECHO-30, ECHO-6 e CBV-5. O número de pacientes hospitalizados em virtude deste surto foi de 1.300 pessoas (Lodder e De Roda Husman 2005, Amvrosieva *et al.* 2006).

Entretanto, as análises de contaminação ambiental devem ser completas, contemplando vários agentes, já que o contrário (água livre de vírus e contaminada por bactérias), também pode ocorrer. Birks e Hills (2007) avaliaram a presença de enterococos fecais e *Escherichia coli* em águas de esgoto doméstico de um bloco universitário de Bedfordshire (Inglaterra), e identificaram altos níveis de contaminação bacteriana, até mais altos do que estudos anteriores relataram. Esse resultado demonstrou contaminação fecal e, assim, a possibilidade da presença de patógenos nessas águas. Após essa análise, pesquisou-se sobre a presença de diversos patógenos, o que resultou na detecção da presença de *Salmonella* sp. e *Giardia*. Entretanto, os resultados para enterovírus foram negativos (Birks & Hills 2007).

Já em estudo realizado em Taiwan, no qual foram analisadas 23 amostras de águas, sendo estas de superfícies de reservatórios, pequenos sistemas de tratamento de esgoto e de águas subterrâneas, sete foram positivas para enterovírus (Hsu *et al.* 2009). Nestas amostras foi observado que a concentração de enterovírus em amostras de águas subterrâneas é menor do que em amostras de águas superficiais (Hsu *et al.* 2009). Neste mesmo estudo, os enterovírus encontrados foram genotipados e a correlação com os casos de enterovirose em humanos na região de estudo notificados analisada. O resultado encontrado foi uma grande similaridade entre os genótipos encontrados nos pacientes com aqueles encontrados nas amostras de água positivas para enterovírus. Os autores concluem que a existência destes vírus na água representaria uma ameaça para a saúde pública local (Hsu *et al.* 2009).

Ainda em Taiwan, amostras de água analisadas por RT-PCR, revelaram que os enterovírus encontrados mais prevalentes foram os tipos CA2, CA6 e EV71 (Chen *et*

al. 2007). Esses resultados estavam de acordo com os resultados epidemiológicos reportados pelo Centro de Controle de Doenças em Taiwan, no mesmo período em que foi realizada a análise (Lee *et al.* 2005). Isso aponta, novamente, a água contaminada como possível fonte dessas infecções (Chen *et al.* 2007). Porém, a RT-PCR detecta a presença desses vírus mesmo quando eles se encontram inativados. Isso impossibilita que se relacione, então, a presença de infecções humanas aos achados nas amostras de água dessa análise. Esse ponto reflete também nos resultados de cultura celular dessas amostras, já que resultados negativos podem estar relacionados a uma concentração de vírus na amostra abaixo do limite de detecção, e não à ausência de vírus infecciosos (Chen *et al.* 2007).

Enterovírus foram também detectados em altas quantidades em amostras de lodo oriundas de estações de tratamento de esgoto (Guzmán *et al.* 2007).

A contradição entre os vários estudos já realizados sobre contaminação fecal associada à presença de enterovírus em variadas fontes aquáticas parece sugerir maior investigação. Enquanto isso, alguns países como Estados Unidos da América e os pertencentes à União Europeia já têm em seus regulamentos governamentais de qualidade da água parâmetros para avaliação do grau de poluição viral da mesma (Kocwa-Hauluch 2001, US EPA 2009). Por outro lado, em outros países ainda é discutida a necessidade desta preocupação e posterior análise.

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE VÍRUS NA ÁGUA

O monitoramento da presença de vírus entéricos humanos no meio ambiente aquático iniciou por volta de 1940. Esse trabalho tem sido aplicado para detecção de vírus animais e humanos, monitoramento microbiano da qualidade da água e, possivelmente, com o objetivo de localizar maiores fontes de poluição da água (Griffin *et al.* 2001).

Em estudos sobre a ocorrência desses vírus no meio ambiente aquático, o isolamento viral em cultivos de células permissivas tem sido a técnica mais usada para detecção e isolamento desses agentes infecciosos. Enterovírus podem ser isolados em cultivo celular a partir de diferentes tipos de ambientes aquáticos como oceanos, rios, água considerada potável, água do solo e do esgoto. Em qualquer que seja a origem do reservatório de água, o processo de detecção de vírus consiste nos seguintes passos: concentração e purificação da amostra de água e, após, isolamento do vírus em cultura de células ou então detecção com uso de técnicas moleculares (Rajtar *et al.* 2008).

Outros métodos de detecção viral tipicamente usado nas amostras clínicas - radioimunoensaio, imunofluorescência, fixação de complemento, e métodos imunoenzimáticos- são muito caros ou então têm baixa sensibilidade para detectar amostras de vírus no meio ambiente (Griffin *et al.* 2003). Recentemente, os métodos

moleculares como a PCR convencional e em tempo real, têm se destacado mais do que todos como ferramenta para detecção de vírus em amostras ambientais, muitas vezes em associação com o isolamento em cultivo celular.

Amostras ambientais contêm com frequência compostos orgânicos e inorgânicos, assim como ácido húmico e fúlmico, polifenóis e metais pesados. Estes compostos costumam ser tóxicos (Muller-Wegener 1988), podendo causar lise nos cultivos celulares e/ou inibir as reações de cadeia em polimerase e transcriptase reversa. Isto se torna ainda mais preocupante quando há a necessidade de concentrar estas amostras, como ocorre com as amostras de água. Logo, na medida em que concentramos a amostra concentramos também possíveis interferentes e inibidores dos procedimentos de detecção (Soler *et al.* 2009). Em estudo recente realizado por Hamza *et al.* (2009) foi observado que vírus não-envelopados com genoma de DNA, tais como Adenovírus, resistem a inibições que possam ocorrer em técnicas moleculares pela presença de compostos diversos nas amostras de água, enquanto que a detecção dos vírus não-envelopados dotados de genoma de RNA, devido à etapa adicional de transcrição do cDNA, pode ser mais afetada pela presença destes compostos. Como consequência a sua presença pode ser subestimada em amostras positivas para os mesmos (Hamza *et al.* 2009). Este fato salienta a dificuldade de detectar patógenos virais em amostras ambientais.

Concentração e purificação

A quantidade de partículas de vírus no meio ambiente natural pode ser pequena (Ehlers *et al.* 2005), o que exige que antes dos processos de detecção de vírus, as amostras de água sejam concentradas. Para isso, lança-se mão de diversas técnicas com a utilização de filtros especiais. A filtração utilizando métodos de adsorção-eluição na própria membrana filtrante é um método bastante empregado. Essas técnicas usam filtros compostos por uma membrana de nitrocelulose dotada de uma determinada carga elétrica, aos quais os vírus se aderem durante o processo de filtração, por atração elétrica entre cargas de partículas virais e do material utilizado.

Depois da filtração, os vírus adsorvidos pelo filtro são removidos e, então, prontos para identificação (Moce-Llivina *et al.* 2005). Dentre os processos de concentração outras técnicas menos utilizadas estão disponíveis, tais como: ultracentrifugação, uso de lã de vidro e outros materiais adsorventes, imunoconcentração (Kittigul *et al.* 2001) e uso de agentes floculantes (Guttman-Bass & Armon 1983), tais como o alumínio (Chang *et al.* 1956, De Camargo & Schatzmayr 1980) ou poli-etileno-glicol (Yang & Xu 1993, El-Esnawy 2000, Kim *et al.* 2008). Essas técnicas podem ser usadas também em combinação (Vecchia *et al.* 2009).

Outra técnica recentemente utilizada por Kovac *et al.* (2009) para concentração de vírus entéricos em amostras de água potável é a cromatografia monolítica de sustentação (monolithic chromatographic support), feita de um único bloco de material poroso, com altos canais de

interconectividade que permitem a transferência rápida de moléculas da amostra entre a fase móvel e estacionária (Kovac 2009, Strancar *et al.* 2002). Já um meio natural de concentração de vírus no ambiente aquático, utilizado como ferramenta para detecção direta dos mesmos, é o uso de moluscos. Estes vêm sendo utilizados como fonte de pesquisa para identificação de vírus entéricos, já que se apresentam como concentradores naturais dos contaminantes de água. Isso se deve ao modo de alimentação destes seres vivos, que filtram e concentram o alimento presente na água e, por consequência, acabam também concentrando vírus que possam estar no mesmo ambiente (Vinatea *et al.* 2006, Soler *et al.* 2009).

Detecção por técnicas moleculares

Técnicas moleculares têm sido usadas extensivamente para a detecção de vírus entéricos em amostras ambientais desde os anos 90. Métodos moleculares de detecção viral, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridização, normalmente são baseados na detecção de porções altamente conservadas do genoma viral (De Leon *et al.* 1990).

O método de PCR oferece várias vantagens na detecção destes patógenos em amostras do meio ambiente quando comparado com os métodos de cultivo celular. A PCR é rápida, tem alta sensibilidade e especificidade (Griffin *et al.* 2003), desde que desenvolvida e padronizada adequadamente. Além disso, a PCR é menos laboriosa e dispõe de menor tempo para detecção viral do que o cultivo celular. Resultados de PCR podem ser obtidos dentro de 24 horas ou menos, enquanto o método de isolamento viral demora de alguns dias a semanas (Fong & Lipp 2005). Outra vantagem da PCR é a possibilidade de diferenciarmos espécies de vírus através dos diferentes oligonucleotídeos iniciadores desenhados ou de métodos complementares, como a clivagem do fragmento amplificado com enzimas de restrição (Fong & Lipp 2005), ou então através do sequenciamento genômico deste mesmo fragmento. Devido à sua alta sensibilidade, a PCR usualmente é capaz de detectar partículas virais mesmo quando essas são tão poucas ou não mais capazes de causar CPE nas células de cultivo (Lee & Jeong 2004).

Para detecção de vírus por PCR as seguintes etapas devem ser realizadas: extração do DNA/RNA, reação em cadeia de polimerase e por fim, a análise do produto de PCR (Chen *et al.* 2008). A diferença existente entre a técnica molecular de análise de vírus de DNA para com vírus de RNA é a técnica que antecede a PCR, a transcrição reversa, necessária para a síntese de cDNA a partir do RNA viral.

O método tradicional de PCR dificulta a quantificação de vírus detectado. Por essa razão, algumas variantes dessa técnica foram desenvolvidas: “nested PCR”, “multiplex PCR”, e “real-time PCR”. Esses processos podem aumentar a sensibilidade e especificidade da reação e até mesmo, no caso do “real-time PCR” possibilitar a determinação quantitativa de material genético viral presente na amostra testada (Rajtar *et al.* 2008).

“Nested PCR”

No “Nested PCR”, dois pares de iniciadores são usados: um externo, e um interno. O primeiro é complementar ao final da sequência de DNA, e o segundo, a um fragmento alvo interno contido na sequência já amplificada. Isso aumenta significativamente a sensibilidade e especificidade da reação (Ehlers *et al.* 2005, Katayama *et al.* 2002).

PCR em tempo real

O método que quantifica o DNA é o “Real-time PCR”. Gregory *et al.* (2006) provaram a efetividade desse processo quando utilizado no controle de contaminação por enterovírus na água. Esse método possui um monitor através do qual é possível analisar a quantidade de produtos da PCR simultaneamente com o programa de PCR. Isso é realizado através de sinais de fluorescência emitidos. (Gregory *et al.* 2006, Rajtar *et al.* 2008). Diversos estudos, principalmente de virologia ambiental, têm utilizado tal ferramenta como forma de aumentar a sensibilidade de detecção da técnica, já que a presença de quantidades mínimas de genoma, o esperado em amostras ambientais, são suficientes para observar positividade pela PCR em tempo real. Em estudo conduzido por Rosa *et al.* a PCR em tempo real foi utilizada para detecção de três diferentes vírus entéricos em amostras ambientais. Esta ferramenta demonstrou ser vantajosa em tal estudo, possibilitando inclusive a segura detecção de todos agentes virais estudados nas amostras então contaminadas (Rosa *et al.* 2010).

Multiplex PCR

A vantagem do “Multiplex PCR” se dá pela possibilidade de adicionar diferentes pares de iniciadores à reação. Dessa maneira, é possível identificar mais de um tipo viral em uma única amostra e reação. A isso, soma-se a vantagem de a técnica requerer pequenas quantidades de material (Bednarska *et al.* 2005, Fong & Lipp 2005). Técnicas do tipo multiplex devem ser padronizadas e adotadas com cautela, por dificuldades inerentes a esta metodologia, tais como competição entre os iniciadores e diferenças na sensibilidade analítica entre os diferentes fragmentos alvo.

(RT) - PCR

Um dos recentes métodos utilizados em biologia molecular é o baseado na transcrição reversa (RT)-PCR, reação que antecede à PCR. Como descrito anteriormente este método se baseia na transcrição de uma fita complementar de DNA à fita simples de RNA dos enterovírus.

Cultivo celular

Para isolamento e identificação de um vírus por cultivo celular, é necessário selecionar uma linhagem de célula a qual deve permitir a multiplicação do vírus. Dessa maneira, quando a linhagem selecionada é infectada, a presença do CPE, isso é, dano e morte celular, é avaliada

(Ehlers, Grabow, Pavlov 2005).

Essa técnica apresenta algumas desvantagens. Uma delas é o fato de algumas espécies, como o coxsackievírus A, terem dificuldade de crescer em culturas celulares. Além disso, a cultura pode resultar na modificação de algumas propriedades dos vírus (Nasri *et al.* 2007).

A grande vantagem do isolamento viral em células é informar sobre a infecciosidade dos vírus presentes na água, pelo fato de que apenas partículas viáveis, ou seja, capazes de infectar células e talvez causar doenças, se multiplicam no cultivo celular. Esta característica difere dos métodos de amplificação de material genômico, que detecta ambos: vírions ou partículas virais inviáveis (Hsu *et al.* 2007, Hsu *et al.* 2009). O isolamento e multiplicação virais também permitem a realização de estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* sobre as características biológicas dos enterovírus isolados, bem como o desenvolvimento de novos métodos de destruição dos mesmos (Hsu *et al.* 2007). Porém, como geralmente a quantidade de enterovírus humano no ambiente aquático é baixa, é necessária a utilização de métodos de isolamento de alta sensibilidade. Assim, sozinha, a detecção por isolamento viral deve provavelmente subestimar os verdadeiros níveis de contaminação nessas fontes ambientais quando comparada aos métodos de PCR (Hsu *et al.* 2007).

Isolamento viral associado à PCR

Métodos de integrar PCR e cultivo celular têm sido utilizados baseando-se na hipótese que, depois de internalizados nas células do cultivo celular, apenas as partículas infecciosas se multiplicam. E, após adequado período de incubação, o material genético viral é retirado das células e é feita a PCR para, então, estimar a presença de enterovírus. Esse método é também recomendado para detectar patógenos que proliferam em linhagens celulares sem provocar efeito citopatogênico (Katayama *et al.* 2002, Fong, Lipp 2005, Kim *et al.* 2006). Juntos estes métodos tendem a minimizar falsos negativos que possam ocorrer devido à presença de inibidores, além de aumentar a sensibilidade de detecção de vírus viáveis nas amostras testadas.

CONCLUSÃO

Vírus entéricos podem estar presentes em diferentes tipos de água. As diretrizes atuais para potabilidade, baseadas na presença ou não de coliformes fecais, podem não informar quanto a eficácia dos métodos de controle de contaminação fecal da água, pois não indicam a presença de agentes virais. Este fato gera preocupação e alguns países como Estados Unidos da América e os pertencentes à União Europeia atualmente têm em seus regulamentos governamentais de qualidade da água parâmetros para análise virológica (Kocwa-Haluch 2001, US EPA 2009). A utilização de métodos para controle de poluição fecal da água que busquem detectar a presença de vírus na mesma tornaria este controle mais sensível que o usual.

Ainda, através dos avanços atuais na biologia molecular maiores expectativas são criadas para a utilização dos

enterovírus como um melhor bioindicador de poluição fecal, devido a esta ferramenta estar sendo utilizada com sucesso na busca de tais patógenos.

Considerando a importância dos enterovírus como risco para a saúde pública e para a agropecuária, a correta detecção deste patógeno em amostras de água parece ter relevante importância epidemiológica.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho tem apoio financeiro da Universidade Feevale, CNPq, IEL/Fiergs e FAPERGS. FRS é bolsista de produtividade do CNPq.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEGAN, M. 2001. Advanced detection of viruses and protozoan parasites in water. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2: 21-26.
- AMVROSIEVA, T.V., PAKLONSKAYA, N. V., BIAZRUCHKA, A. A., KAZINETZ, O. N., BOHUSH, Z. F. & FISENKO, E. G. 2006. Enteroviral infection outbreak in the Republic of Belarus: principal characteristics and phylogenetic analysis of etiological agents. *Central European Journal of Public Health*, 14: 67-73.
- AUERBACH, J., PRAGER, D., NEUHAUS, S., LOSS, U. & WITTE, K. H. 1994. Grouping of porcine enteroviruses by indirect fluorescence and description of two new serotypes. *Journal of Veterinary Medicine Series*, 41: 277-282.
- BELGUTH, K., HASSEN, A., BOUSLAMA, L., KHIRA, S. & AOINI, M. 2007. Enterovirus circulation in wastewater and behavior of some serotypes during sewage treatment in Monastir, Tunisia. *Journal of Environmental Health*, 69: 52-56.
- BERNIT, E., DE LAMBALLERIE, X., ZANDOTTI, C., BERGER, P., VEIT, V., SCHLEINITZ, N., DE MICCO, P., HARLÉ, J. R. & CHARREL, R. N. 2004. Prospective investigation of a large outbreak of meningitis due to echovirus 30 during summer 2000 in Marseilles, France. *Medicine*, 83: 245-53.
- BIRKS, R. & HILLS, M. S. 2007. Characterisation of indicator organisms and pathogens in domestic greywater for recycling. *Environmental Monitoring and Assessment*, 129: 61-69.
- BLAS-MACHADO, U., SALIKI, J. T., BOILEAU, M. J., GOENS, S. D., CASELTINE, S. L., DUFFY, J. C. & WELSH, R. D. 2007. Fatal Ulcerative and Hemorrhagic Typhlocolitis in a Pregnant Heifer Associated with Natural Bovine Enterovirus Type-1 Infection. *Veterinary Pathology*, 44: 110-115.
- BRASIL Ministério da Saúde. 2004. In: Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004. *Lex. Legislação federal e marginalia*. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/legislacao/portaria518_25_03_04.pdf> Acesso em: 15 Fev. 2010.
- CARTER, M. J. 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1354-1380.
- CHANG, S. L., CLARKE, N. A., KABLER, P. W. & STEVENSON, R. E. 1956. Concentration of dilute virus suspensions by alum flocculation. *Proceedings Society for Experimental Biology and Medicine*, 92: 764-767.
- CHEN, C. H., HSU, B. M. & WAN, M. V. 2007. Molecular detection and prevalence of enterovirus within environmental water in Taiwan. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 817-823.
- CHEN, C.H., HSU, B.M., & WAN, T. M. 2008. Detection of Enteroviruses within Brackish Water from the Damshui River Watershed, Taiwan. *Journal of Environmental Engineering*, 134: 438-496.
- COMMITTEE ON THE ECHO VIRUSES. 1955. Enteric cytopathogenic human orphan (ECHO) viruses. *Science*, 122: 1187-1188.
- ĆOSIĆ, G., ĐURIĆ, P., ĐEKIĆ, J., ČANAK, G. & TURKULOV, V. 2010. Ongoing outbreak of aseptic meningitis associated with echovirus type 30 in the City of Novi Sad, Autonomous Province of Vojvodina, Serbia, June - July 2010. *Eurosurveillance*, 15: 19638.
- DALLDORF, G. & SICKLES, G. M. 1948. An unidentified filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. *Science*, 108: 61-62.
- DECAESSTECKER, M., G. 1989. Pathogenicity of fowl enteroviruses. *Avian Pathology*, 18: 697-713.
- DE CAMARGO, I. & SCHATZMAYR, H. 1980. Sobre um método de concentração de enterovírus em água de esgoto pelo hidróxido de alumínio. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 75: 111-115.
- DE LEON, R., SHIEH, C., BARIC, R. S., & SOBSEY, M. D. 1990. Presented at the Proceedings of the 1990 Water Quality Technology. *Denver, Mimeografado*.
- DIAS, A. P. M., TAVARES, F. N., COSTA, E. V. & SILVA, E. E. 2009. Evaluation of a protocol for rapid diagnosis of enterovirus associated with acute flaccid paralysis cases. *Journal of Clinical Virology*, 46: 337-340.
- DHOLE, T.N., AYYAGARI, A., CHOWDHARY, R., SHAKYA, A.K., SHRIVASTAV, N., DATTA, T. & PRAKASH, V. 2009. Non-polio enteroviruses in acute flaccid paralysis children of India: vital assessment before polio eradication. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 45: 409-413.
- EHLERS, M. M., GRABOW, W. O. & PAVLOV, D. N. 2005. Detection of enteroviruses in untreated and treated drinking water supplies in South Africa. *Water Research*, 30: 2253-2258.
- EL-ESNAWY, N. A. 2000. Examination for hepatitis E virus in wastewater treatment plants and workers by nested RT-PCR and ELISA. *Journal of Egyptian Public Health Association*, 75: 219-231.
- ENDERS, J. F., WELLER, T. H. & ROBBINS, F. C. 1949. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissue. *Science*, 109: 85-87.
- IORE, A. E. 2004. Hepatitis A transmitted by food. *Clinical Infectious Diseases*, 38: 705-715.
- FONG, T. T. & LIPP, E. K. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Reviews*, 69: 357-371.
- GOENS, S. D., BOTERO, S., ZEMLA, A., ZHOU, C. E. & PERDUE, M. L. 2004. Enterovirus: complete genomic sequence and molecular modelling of a reference strain and a wild-type isolate from endemically infected US cattle. *Journal of General Virology*, 85: 3195-3203.
- GREGORY J. B., LITAKER, R. W. & NOBLE, R. T. 2006. Rapid one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay with competitive internal positive control for detection of enteroviruses in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3960-3967.
- GRIFFIN, D. W., LIPP, E. K., MCLAUGHLIN, M. R. & ROSE, J. B. 2001. Marine recreation and public health microbiology: quest for the ideal indicator. *BioScience*, 51: 817-825.
- GRIFFIN, D. W., DONALDSON, K. A., PAUL, J. H. & ROSE, J. B. 2003. Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 129-143.
- GUR, S., YAPKIC, O. & YILMAZ, A. 2008. Serological survey of bovine enterovirus type 1 in different mammalian species in Turkey. *Zoonoses and Public Health*, 55: 106-111.
- GUTTMAN-BASS, N. & ARMON, R. 1983. Concentration of simian rotavirus SA-11 from tap water by membrane filtration and organic flocculation. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 850-855.

- GUZMÁN, C., JOFRE, J., MONTEMAYOR, M. & LUCENA, F. 2007. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolids. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2420-2429.
- HAAS, C.N., ROSE, J. B., GERBA, C. & REGLI, S. 1993. Risk assessment of viruses in drinking water. *Risk Analysis*, 13: 545-552.
- HAMBLIN, C., KNOWLES, N. J. & HEDGER, R. S. 1985. The isolation and identification of bovid enteroviruses from free-living wild animals in Botswana. *Veterinary Record*, 116: 238-239.
- HAMZA, I. A., JURZIK, L., STANG, A., SURE, K., UBERLA, K. & WILHELM, M. 2009. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Research*, 43: 2657-2668.
- HARDING, J. D. DONE, J. J. T. & KERSHAW G. F. 1957. A transmissible polio-encephalomyelitis of pigs (Talfan disease). *Veterinary Record*, 69: 824-932.
- HEBERLING, R. L. & CHEEVER, F. S. 1965. Some characteristics of the simian enteroviruses. *American Journal of Epidemiology*, 81: 106-123.
- HOFFERT, W. R., BATES M. E. & CHEEVER, F. 1958. Study of enteric viruses of simian origin. *American Journal of Hygiene*, 68: 15-30.
- HONDA, E., KIMATA, A., HATTORI, I., KUMAGAI, T., TSUDA, T. & TOKUI, T. 1990. A serological comparison of 4 Japanese isolates of porcine enteroviruses with the international reference strains. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 52: 49-54.
- HSU, B.M., CHEN, C.H., KUNG, C.M., WAN, M.T. & SHEN, S.M. 2007. Evaluation of enterovirus recovery in surface water by different adsorption and elution procedures. *Chemosphere*, 66: 964-969.
- HSU, B. M., CHEN, C. H., WAN, M. T., CHANG, P. J. & FAN, C.W. 2009. Detection and identification of enteroviruses from various drinking water sources in Taiwan. *Journal of Hydrology*, 365: 134-139.
- HULL, R. N., MINNER, J. R. & SMITH, J. W. 1956. New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. I. Origin and properties of cytopathogenic agents S.V.1, S.V.2, S.V.4, S.V.5, S.V.6, S.V.11, S.V.12, and S.V.15. *American Journal of Hygiene*, 63: 204-215.
- HULL, R. N., MINNER, J.R. & MASCOLI, C.C. 1958. New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. III. Recovery of additional agents both from cultures of monkey tissues and directly from tissues and excreta. *American Journal of Hygiene*, 68: 31-44.
- HYPIA, T., HOVI, T., KNOWLES, N. J. & STANWAY, G. 1997. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *Journal of General Virology*, 78: 01-11.
- ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2009. In: Lista de taxonomia dos vírus. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>> Acesso em: 16 Jan. 2010.
- JIMENEZ-CLAVERO, M. A., ESCRIBANO-ROMERO, E., MANSILLA, C., GOMEZ, N., CORDOBA, L., ROBLAS, N., PONZ, F., LEY, V. & SAIZ, J. 2005. Survey of Bovine enterovirus in biological and environmental samples by a highly sensitive real-time reverse transcription-PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 3536-3543.
- JOHNSON, D.C., ENRIQUEZ, C. E., PEPPER, I. L., DAVIS, T. L., GERBA, C. P. & ROSE, J. B. 1997. Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, Poliovirus and *Salmonella* in marine waters. *Water Science and Technology*, 35: 261-268.
- KAKU, Y., SARAI, A. & MURAKAMI, Y. 2001. Genetic reclassification of porcine enteroviruses. *Journal of General Virology*, 82: 417-424.
- KAKU, Y., YAMADA, S. & MURAKAMI, Y. 1999. Sequence determination and phylogenetic analysis of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of the porcine enterovirus 1 (PEV-1) Talfan strain. *Archives of Virology*, 144: 1845-1852.
- KALTER, S. S. 1982. Enteric viruses of nonhuman primates. *Veterinary Pathology*, 19: 33-43.
- KATAYAMA, H., SHIMASAKI, A. & OHGAKI, S. 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of Enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 1033-1039.
- KEW, O.M., SUTTER, R.W., GOURVILLE, E.M., DOWDLE, W.R. & PALLANSCH, M.A. 2005. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annual Review of Microbiology*, 59: 587-635.
- KHETSURIANI, N., LAMONTE-FOWLKES, A., OBERST, S. & PALLANSCH, M. A. 2006. Centers for Disease Control and Prevention: Enterovirus surveillance - United States, 1970-2005. *MMWR Surveillance Summaries*, 55: 1-20.
- KIANG, D., NEWBOWER, E. C., YEH, E., WOLD, L., CHEN, L. & SCHNURR, D. P. 2009. An algorithm for the typing of enteroviruses and correlation to serotyping by viral neutralization. *Journal of Clinical Virology*, 45: 334-340.
- KIM, H. J., SHIN, Y. O. & KIM, S. H. 2006. Detection of enteroviruses and mammalian reoviruses in Korean environmental waters. *Microbiology and Immunology*, 50: 781-786.
- KIM, D., KIM, S. R., KWON, K. S., LEE, J. W. & OH, M. J. 2008. Detection of hepatitis a virus from oyster by nested PCR using efficient extraction and concentration method. *Journal of Microbiology*, 46: 436-440.
- KING, A.M.Q., BROWN, F., CHRISTIAN, P., HOVI, T., HYPPIA, T., KNOWLES, N.J., LEMON, S.M., MINOR, P.D., PALMENBERG, A.C., SKERN, T. & STANWAY, G. 2000. *Virus taxonomy: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York: Academic Press. p. 657-673.
- KITTIGUL, L., KHAMOUN, P., SUJIRARAT, D., UTRARACHKIJ, E., CHITPIROM, K., CHAICHANTANAKIT, N. & VATHANOPHAS, K. 2001. An improved method for concentrating rotavirus from water samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 815-821.
- KMETZSCH, C. I., BALKIE, E. M., MONTEIRO, A., COSTA, E. V., DOS SANTOS, G. P. & DA SILVA, E. E. 2006. Echovirus 13 aseptic meningitis. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 1289-1290.
- KNOWLES, N. J., BUCKLEY, L. S. & PEREIRA, H. G. 1979. Classification of porcine enteroviruses by antigenic analysis and cytopathic effects in tissue culture: description of 3 new serotypes. *Archives of Virology*, 62: 201-208.
- KNOWLES, N. J. & BARNETT, I. T. R. 1985. A serological classification of bovine enteroviruses. *Archives of Virology*, 83: 141-155.
- KOCWA-HALUCH, R. 2001. Waterborne enteroviruses as a hazard for human health. *Polish Journal of Environmental Studies*, 10: 485-487.
- KOVAC, K., GUTIÉRREZ-AGUIRREB, I., BANJACC, M., PETERKA, M., POLJSKAK-PRIJATELJ, M., RAVNIKARB, M., MIJOVSKI, J. Z., SCHULTZE, A. C. & RASPORA, P. 2009. A novel method for concentrating hepatitis A virus and caliciviruses from bottled water. *Journal of Virological Methods*, 162: 272-275.
- KRUMBHOLZ, A., DAUBER, M., HENKE, A., BIRCHHIRSCHFELD, E., KNOWLES, N. J., STELZNER, A. & ZELL, R. 2002. Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups. *Journal of Virology*, 76: 5813-5821.
- LAMHOUEB, S., FLISS, I., NGAZOA, E. & JEAN, S.J. 2008. Evaluation of the persistence of infectious human Noroviruses on food surfaces using molecular beacon-based nucleic acid sequence-based amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 3349-3355.
- LARRY, I. & LUTWICK. 2006. In: Picornavirus-Overview (online). Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/225483-overview>> Acesso em: 04 Nov 2009.

- LEE, H.K. & JEONG, Y.S. 2004. Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3632-3636.
- LEE, S.G., LIN, T.L., KO, Y.F., YANG, W.C., WU, S.L., WANG, S.F., YANG, S.Y. & YANG, C.Y. 2005. Analysis of epidemic serotypes of enterovirus in Taiwan during 1998-2004. *Epidemiology Bulletin*, 21: 96-117.
- LEITCH, E.C., HARVALA, H., ROBERTSON I, UBILLOS, I., TEMPLETON, K. & SIMMONDS, P. 2009. Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region. *Journal of Clinical Virology*, 44: 119-124.
- LOCAS, A., BARTHE, C., BARBEAU, B., CARRIE' RE, A. & PAYMENT, P. 2007. Virus occurrence in municipal groundwater sources in Quebec, Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 688-694.
- LODDER, W. J. & DE RODA HUSMAN, A. M. 2005. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1453-1461.
- MALHERBE, H. & HARWIN, R. 1963. The cytopathic effects of vervet monkey viruses. *South African Medical Journal*, 37: 407-411.
- MCCARTHY, F.M., SMITH, G.A. & MATTICK, J.S. 1999. Molecular characterisation of Australian bovine enteroviruses. *Veterinary Microbiology*, 68: 71-81.
- MCNEILLY, F., CONNOR, T.J., CALVERT, V.M., SMYTH, J.A., CURRAN, W.L., MORLEY, A.J., THOMPSON, D., SINGH, S., MCFERRAN, J.B., ADAIR, B. & MCNULTY, M.S. 1994. Studies on a new enterovirus-like virus isolated from chickens. *Avian Pathology*, 23: 313-327.
- MCNULTY, M.S., ALLAN, G.M., CONNOR, T.J., MCFERRAN, J.B. & MCCracken, R.M. 1984. An entero-like virus associated with the runting syndrome in broiler chickens. *Avian Pathology*, 13: 429-439.
- MCNULTY, M.S., ALLAN, G.A. & MCFERRAN, J.B. 1987. Isolation of a novel avian entero-like virus. *Avian Pathology*, 16: 107-113.
- MCNULTY, M.S., CONNOR, T.J., MCNEILLY, F. & MCFERRAN, J.B. 1990. Biological characterisation of avian enteroviruses and enteroviruslike viruses. *Avian Pathology*, 19: 75-87.
- MOCE-LLIVINA, LUCENA F. & JOFFRE, J. 2005. Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6838-6844.
- MONROE, S. S., CARTER, M. J., HERRMANN, J., MITHCEL, D. K. & SANCHEZ-FAUQUIER., FAUQUET, C., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. & BALL, L. A. 2005. *Astroviridae. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. San Diego California. Elsevier Academic Press. p. 859-864.
- MULLER-WEGENER, U. 1988. *Interaction of humic substances with biota*. Humic substances and their role in the environment. John Wiley and Sons, New York. p. 179-192
- NASRI, D., BOUSLAMA, L., PILLET, S., BOURLET, T., AOUNI, M. & POZZETTO, B. 2007. Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 07: 419-434.
- NIX, W., JIANG, B., MAHER, K., STROBERT, E. & OBERSTE, M. S. 2008. Identification of Enteroviruses in Naturally Infected Captive Primates. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 2874-2878.
- PINTO JUNIOR, V. L., REBELO, M. C., COSTA, E. V., SILVA, E. E. & BÓIA, M. N. 2009. Description of a widespread outbreak of aseptic meningitis due to Echovirus 30 in Rio de Janeiro state, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 5: 367-370
- RACANIELLO, V.R. 2007. *Picornaviridae: the viruses and their replication*. Fields Virology, vol. 1. Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 795-838.
- RAJTAR, B., MAJEK, M., POLAŃSKI, Ł. & POLZ-DACEWICZ, M. 2008. Enteroviruses in water environment - A potential threat to public health. *American Agriculture of Environmental Medical*, 15: 199-203.
- ROIVAINEN, M. 2006. Enteroviruses: New findings on the role of enteroviruses in type 1 diabetes. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38: 721-725.
- SABIN, A.B. 1955. Behavior of chimpanzee-avirulent poliomyelitis viruses in experimentally infected human volunteers. *American Journal of the Medical Sciences*, 230: 1-8.
- SALK, J.E. 1953. Recent studies in immunization against poliomyelitis. *Pediatrics*, 12: 471-482.
- SARMIENTO, L., RODE, E.C., LAGO, P.M. & HORTA, O.D. 2007. Antibodies to human glutamic acid decarboxylase in sera from enterovirus-immunized rabbit. *Autoimmunity*, 40: 546-547.
- SCHATZMAYR, H.G., FILIPIS, A. M.B. & FRIEDERICH, F. 2002. Erradicação da poliomielite no Brasil: a contribuição da Fundação Oswaldo Cruz. *História, Ciências, Saúde*, 9: 11-24.
- SEAN, P. & SEMLER, B.L. 2008. Coxsackievirus BRNA replication: lessons from poliovirus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 323: 89-121.
- SEDMAK, G., BINA, D. & MACDONALD, J. 2003. Assessment of an enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from Milwaukee, Wisconsin, collected August 1994 to December 2002. *Applied and Environmental Microbiology*, 12: 7181-7187.
- SHARMA, A.K., KNOWLES, N.J., PRASAD, S. & SRIVASTAVA, R.N. 1986. Preliminary studies on a sheep enterovirus. *Indian Journal of Virology*, 2: 86-88.
- SINHA, S., KAPILA, R., SCHWARTZ, R.A., DUA, P. & BERKOWITZ, L.B. 2009. In: Enteroviruses. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/217146>>. Acesso em: 25 fev. 2009.
- SMYTH, J.A., CONNOR, T.J., MCNEILLY, F., MOFFET, D.A., CALVERT, V.M. & MCNULTY, M.S. 2007. Studies on the pathogenicity of enterovirus-like viruses in chickens. *Avian Pathology*, 36: 119-126.
- SOLER, M., LOBOS, S., LORCA, M. & NAVARRETE. 2009. Enterovirus en aguas naturales de Valparaíso: una propuesta metodológica para su análisis. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44: 511-516.
- SPACKMAN, D., GOUGH, R.E., COLLINS, M.S. & LANNING, D. 1984. Isolation of an enterovirus-like agent from the meconium of dead-in shell chicken embryos. *Veterinary Record*, 114: 216-218.
- FAUQUET, C., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. & BALL, L. A. 2005. Picornaviridae. *Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses: eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. San Diego, California. Elsevier Academic Press. p. 757-778.
- STRANCAR, A., PODGORNIK, A., BARUT, M. & NECINA, R. 2002. Short monolithic columns as stationary phases for biochromatography. In: *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology Modern Advances in Chromatography*. vol. 76. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 49-85.
- URAKAWA, T. & SHINGU, M. 1987. Studies on the classification of bovine enteroviruses. *Microbiology and Immunology*, 31: 771-778.
- US EPA - United States Environmental Protection Agency. 2001. In: *Manual of Methods for Virology*. Disponível em: <<http://www.epa.gov/microbes/about.htm>>. Acesso em: 01 set. 2009.
- VECCHIA, A., SPILKI, F.R., FREZZA, R.B., SILVA, J.V.S. & COMERLATO, J. 2009. Padronização de uma técnica de concentração de vírus entéricos em amostras ambientais. *Anais Inovamundi*. Novo Hamburgo: Ed da Universidade Feevale. 2: 474-485.
- VINATEA, E.B., SINCERO, T.C.M., SIMOES, C.M.O. & BARADI, C.R.M. 2006. Detection of poliovirus type 2 in oyster by using

- cell culture and RT-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37: 64-69.
- WETZ, J.J., LIPP, E.K., GRIFFIN, D.W., LUKASIK, J., WAIT, D., SOBSEY, M.D., SCOTT, T.M. & ROSE, J.B. 2004. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 698-704.
- WHO - World Health Organization. 2003. In: Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. Disponível em: <<http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF03/www737.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2009.
- WHO - World Health Organization. 2006. In: Guidelines For Drinking-Water Quality. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/GDW7rev1and2.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2009.
- YANG, F. & XU, X. 1993. A new method of RNA preparation for detection of hepatitis A virus in environmental samples by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological*, 43: 77-84.
- YIN, J., LIU, Y., WIMMER, E. & PAUL, A.V. 2007. Complete protein linkage map between the P2 and P3 non-structural proteins of poliovirus. *Journal of General Virology*, 88: 2259-2267.
- YLIPAASTO, P., KLINGEL, K., LINDBERG, A.M., OTONKOSKI, T., KANDOLF, R. & HOVI, T. 2004. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia*, 47: 225-239.
- YOON, J.W., AUSTIN, M., ONODERA, T. & NOTKINS, A.L. 1979. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *New England Journal of Medicine*, 300: 1173-1179.
- ZELL, R.M., DAUBER, M., KRUMBHOLZ, A., HENKE, A., BIRCH-HIRSCHFELD, E., STELZNER, A., PRAGER, D. & WURM, R. 2001. Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. *Journal of Virology*, 75: 1620-1631.
- ZELL, R., KRUMBHOLZ, A., DAUBER, M., HOEY, E. & WUTZLER, P. 2006. Molecular-based reclassification of the bovine enteroviruses. *Journal of General Virology*, 87: 375-385.
- ZHANG, G., WILDSEN, G., KNOWLES, N.J. & MCCAULEY, J.W. 1993. Complete nucleotide sequence of a coxsackie B5 virus and its relationships to swine vesicular disease virus. *Journal of General Virology*, 74: 845-853.