

## DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE VÍRUS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA\*\* Rapid virus diagnosis by electron microscopy

Marli UEDA,  
Hatune TANAKA\*  
Jonas J. KISIELIUS  
Paulo P. JOAZEIRO  
Dalton R. WEIGL

RIALA6/785

UEDA, M.; TANAKA, H.; KISIELIUS, J. J.; JOAZEIRO, P. P.; WEIGL, D. R. - Diagnóstico Rápido de vírus por Microscopia Eletrônica. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):57-65, 1995.

RESUMO: A Seção de Microscopia Eletrônica (ME) do Instituto Adolfo Lutz (IAL) realiza diagnósticos rápidos de: Herpesvírus, Poxvírus, Papilomavírus, Rotavírus, Adenovírus, Astrovírus, Calicivírus, "Small Round Vírus Particles-SRVP", agente de Norwalk, Parvovírus e bacteriófagos em diversas amostras biológicas. Contribui também no controle de qualidade de antígenos virais como Sarampo, Influenza, Rocio, Dengue, Hepatite A e B, HIV e outros. A coloração negativa é uma das técnicas utilizadas no diagnóstico rápido de vários vírus associados às doenças humanas. A morfologia, a subestrutura e o diâmetro são características importantes para diferenciar esses vírus. Apesar da impossibilidade de se realizar exames em larga escala, do alto custo e da necessidade de técnicos especializados, é uma técnica de fácil execução, com obtenção rápida do resultado. É útil para detectar vírus de difícil cultivo e é o único método que permite observar mais de um agente numa mesma amostra. Embora existam vários laboratórios de ME em Universidades e em Instituições de Pesquisa, cada laboratório está empenhado em sua linha de pesquisa e são poucos os que se dedicam à área de diagnóstico rápido de vírus.

DESCRIPTORES: Microscopia Eletrônica, Coloração Negativa, Vírus, Diagnóstico.

### INTRODUÇÃO

O uso da microscopia eletrônica para detecção de partículas virais, pela coloração negativa, é um dos métodos utilizados como diagnóstico auxiliar nas diferentes infecções virais humanas<sup>1, 12, 13, 16, 19, 32, 46</sup>. A morfologia, a subestrutura e o diâmetro são características importantes para diferenciar esses vírus<sup>16</sup>.

A técnica de coloração negativa desenvolvida em 1959 por Brenner & Horne<sup>5</sup> proporciona um grande aumento no contraste da imagem e rapidez na preparação da amostra. Em consequência disso difundiu-se rapidamente, tendo o uso crescente na área de diagnóstico viral e ampla aplicação nas pesquisas em Virologia.

A coloração negativa foi utilizada, pela primeira vez, no diagnóstico de infecções virais de importância em Saúde Pública, em 1962, por Peters e col.<sup>37</sup>, na epidemia de *Variola major*, ocorrida na Alemanha. Na Inglaterra, em 1966, durante uma epidemia de

*Variola minor*, Cruickshank e col.<sup>7</sup> introduziram essa técnica no diagnóstico de *Small pox*.

Outros autores como Doane e col.<sup>11</sup>, em 1967, e Joncas e col.<sup>22</sup>, em 1969, descreveram o uso da coloração negativa no diagnóstico de Paramixovírus e vírus respiratório sincicial, respectivamente, em amostras de secreções nasofaríngeas.

Desde o trabalho inicial de Kapikian e col.<sup>23</sup> em 1972, que pela imunomicroscopia eletrônica, descreveram o agente de Norwalk, o primeiro vírus associado à gastroenterites; inúmeros outros vírus foram sendo descritos progressivamente. Em 1973, Flewett e col.<sup>17</sup>, examinando amostras fecais diarreicas por coloração negativa, detectaram pela primeira vez os Rotavírus, de grande importância nas gastroenterites infantis. Também por esta técnica, outros vírus associados a gastroenterites como Astrovírus<sup>30</sup> e Calicivírus<sup>18, 31</sup> foram pela primeira vez detectados em 1975 e 1976, respectivamente. Devido à dificuldade de cultivo *in vitro*, de alguns desses grupos de vírus

\* Correspondência para Marli Ueda, Seção de Microscopia Eletrônica, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, CEP nº 01246-902, Brasil.

\*\* Parte deste trabalho foi apresentado no XIV Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, realizado em Caxambu, Minas Gerais, no período de 31/08 a 03/09/93.

associados a gastroenterites, a microscopia eletrônica continua sendo um dos meios disponíveis de detecção, mesmo nos grandes centros de pesquisa<sup>14, 15, 21, 27, 29, 32, 33</sup>.

A Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz vem realizando diagnóstico rápido de vírus, desde 1967. Na ocasião, a Seção colaborou intensamente na "Campanha de Erradicação da Varíola" detectando Poxvírus em crostas ou conteúdos vesiculares provenientes de pacientes com Varíola<sup>38</sup>. A partir de então, diferentes tipos de vírus têm sido analisados em nosso laboratório, em diversas amostras biológicas, ampliando o nosso leque de detecção<sup>25, 26, 41, 42, 43, 44, 45, 46</sup>.

O objetivo deste trabalho é divulgar os resultados obtidos pela Seção de Microscopia Eletrônica do I.A.L., no diagnóstico de vírus de importância em Saúde Pública e difundir a aplicação da coloração negativa para fins de detecção viral, no nosso meio.

## MATERIAL E MÉTODOS

A Seção de Microscopia Eletrônica do I.A.L. recebe da rede hospitalar pública, diversos tipos de amostras biológicas de pacientes com suspeita de infecções virais, para diagnóstico rápido de vírus. Os tipos de amostras são: - líquidos vesiculares, crostas, raspados de lesão, urina e saliva para detecção de vírus do grupo Herpes; lesões cutâneas para detecção de Papovavírus, Moluscum contagiosum e eventualmente Pox-vírus. Em fezes diarréicas são detectados os vírus associados à gastroenterites (Rotavírus, Adenovírus, Astrovírus, Calicivírus, "Small Round Virus Particles - SRVP", agente de Norwalk, Parvovírus e Coronavírus). São realizadas pesquisas de "Parvovirus-like" em urina e soro de pacientes com suspeita de eritema infeccioso<sup>43</sup>.

Atua no controle de qualidade morfológico de antígenos virais, analisando purificados de amostras com vírus Sarampo, Influenza, Hepatites (A,B), Rocio, Dengue, HIV e outros. Também, realiza detecção de bacteriófagos para o controle de qualidade microbiológica da água e de alimentos<sup>20</sup>.

Na Microscopia Eletrônica Direta (MED), grades de cobre de 300 "mesh", recobertas com formvar e carvão são utilizadas para a adesão das amostras. Quando a amostra biológica é líquida, como por exemplo líquido vesicular, utiliza-se o próprio material para a adesão. Sendo sólida, como por exemplo as fezes, é preparada uma suspensão a 10% em PBS 0,01M pH 7,0 ou ainda quando a amostra é biópsia de uma lesão, como por exemplo verruga, é feito um macerado da amostra. Para a adesão, a grade é colocada sobre uma gota de 30 µl da amostra. Após a adesão por 30 minutos, o excesso é retirado com papel de filtro e antes de secar, a grade é corada com PTK (fosfotungstato de potássio) a 2%, pH 6.4 a 6.8 por 5 minutos. Após a secagem é examinada num microscópio eletrônico Philips EM-400T, operando a 80 kV.

A Imunomicroscopia Eletrônica (IME) tem sido empregada quando se dispõe de anti-soros específicos. São utilizados 2 métodos de IME: a Imunomicroscopia Eletrônica Clássica, segundo Almeida<sup>2</sup> e a "Solid Phase Immune Electron Microscopy - SPIEM"<sup>9,39</sup>; dependendo da quantidade de antígeno e de anticorpo disponíveis. Enquanto no "SPIEM", a reação é realizada sobre a grade de ME, na IME-Clássica, a reação antígeno-anticorpo é realizada em tubo de ensaio e posteriormente transferida para a grade de ME. Tanto na IME-Clássica quanto no "SPIEM", a concentração de anticorpo deve ser titulada para que ocorra uma boa reação imunológica.

## RESULTADOS

Foram analisadas pela técnica de coloração negativa 7558 amostras de diversos materiais biológicos, no período de 1967-93, dos quais 2284 (30,22%) apresentaram partículas de vírus.

Os resultados positivos de algumas dessas amostras são apresentados nas figuras.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A morfologia e o tamanho da partícula viral observada na coloração negativa, são características que auxiliam na identificação dos vírus, permitindo classificá-los em famílias ou grupos, fornecendo, portanto, um diagnóstico presuntivo<sup>1,16</sup>.

Existem diversos sais elétron-densos que podem ser utilizados como corantes eletrônicos: acetato de uranila, silicotungstato de sódio e molibdato de amônio. Barth<sup>1</sup>, em 1984, realizou um estudo utilizando vários sais eletron-densos; entretanto, o mais utilizado em nosso laboratório, com bons resultados, tem sido o fosfotungstato de potássio (PTK) 2%, pH6.4 a 6.8.

Nossa experiência mostra que são vários os fatores que interferem na obtenção de resultados satisfatórios para detecção de vírus em amostras biológicas. Entre eles ressalta-se a quantidade de vírus presentes na amostra, que também é referido por outros autores<sup>1, 13, 16, 21, 27</sup>. As amostras devem ser colhidas na época apropriada, ou seja, no início dos sintomas, quando a presença do vírus é maior. O diâmetro da partícula viral é outro fator importante. Quanto menor a partícula viral, maior será a quantidade de vírus necessária para que seja detectado<sup>1</sup>. Outro fator essencial é a preservação da partícula viral, pois o diagnóstico por M.E. depende da morfologia. Assim, a colheita, transporte e estocagem das amostras são itens importantes que influenciam na preservação dos vírus. As amostras não devem ser congeladas, devem ser mantidas em banho de gelo (4°C), pois o congelamento e descongelamento podem levar à destruição das características morfológicas de alguns vírus<sup>21, 27</sup>.

O vírus do grupo Herpes (fig. 1-A) é um dos mais facilmente diagnosticados, pois além do seu diâmetro (cerne de aproximadamente 75 nm com envoltório pleomórfico de 180 a 200nm), apresenta morfologia bastante característica<sup>13</sup>, sendo detectado geralmente em grande quantidade nas amostras biológicas colhidas adequadamente<sup>1</sup>. Apesar da morfologia não diferenciar os tipos dos vírus do grupo Herpes, a detecção de vírus por MED tem papel importante principalmente em infecções herpéticas propriamente dita em berçários e em centros cirúrgicos, e também como infecções oportunistas em pacientes aids. Morfologias atípicas foram detectadas nos vírus desses pacientes, até então não observadas<sup>46</sup>. Este diagnóstico tem sido utilizado também para a monitoração na terapêutica de administração de drogas antivirais, não só em pacientes aids, mas também em outros pacientes imunodeprimidos.

Os Papilomavírus também podem ser demonstrados na coloração negativa, pois possuem morfologia bem definida<sup>36,40</sup>. São vírus icosaédricos com diâmetro em torno de 55 nm, sem envoltório<sup>13</sup>, apresentando nítidos capsômeros (fig. 1-B). A detecção destes vírus por MED tem contribuído para a conclusão do diagnóstico, em casos de pacientes com lesões verruciformes não características.

As amostras de verrugas devem ser homogeneizadas para que as partículas virais sejam liberadas, antes de serem submetidas à coloração negativa.

Outro vírus que não apresenta dificuldade de detecção é o Poxvírus (fig. 1-C). Possui a maior dimensão entre os vírus animais conhecidos (115 x

350nm)<sup>13,16</sup> e morfologia típica em forma de tijolo<sup>34</sup>. O diagnóstico de vírus do grupo Pox por MED, em líquido vesicular e crosta de lesões de pacientes com suspeita de Varíola, teve papel relevante na década de 60, durante a “Campanha de Erradicação da Varíola”<sup>38</sup>. Nessa ocasião, por apresentarem morfologias distintas, o diagnóstico diferencial de vírus do grupo Pox do vírus do grupo Herpes, foi importante nos casos clínicos atípicos. Atualmente, os eventuais casos de pacientes com lesões cutâneas suspeitos de *Moluscum contagiosum*, clinicamente difíceis de serem diagnosticados, podem ser detectados por microscopia eletrônica.

Dos vírus associados às gastroenterites, os Rotavírus e os Adenovírus (figs. 2-A e 2-B), possuem características morfológicas bem definidas, facilitando suas detecções. Quanto aos Adenovírus, apesar de não ser possível se diferenciar pela morfologia os Adenovírus entéricos dos Adenovírus respiratórios a sua detecção em amostras fecais diarreicas é importante. Em relação aos Rotavírus, existe o teste imunoenzimático comercial disponível, que detecta apenas Rotavírus do grupo A. Nos casos de Rotavírus atípicos, a MED desempenha junto com a EGPA (eletroforese em gel de poliácridamida), importante diagnóstico diferencial, uma vez que os testes imunoenzimáticos resultam negativos.

A MED se destaca nos diagnósticos de Astrovírus e Calicivírus, vírus associados a gastroenterites, pouco conhecidos, mas já detectados em nosso meio<sup>25, 26, 28, 35, 41,44</sup>. Por serem estes agentes de crescimento difícil *in vitro*, ainda a detecção por coloração negativa é

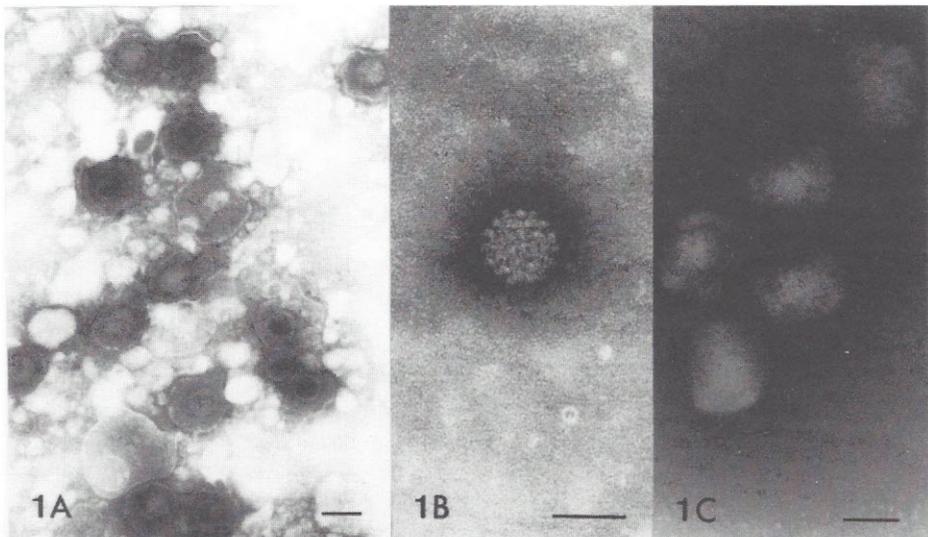


Fig.1 - Fotomicrografias eletrônicas de vírus causadores de lesão de pele. Microscopia Eletrônica Direta. 1-A: Vírus do grupo Herpes em líquido vesicular de paciente portador de HIV. Barra 100 nm. 1-B: Papilomavírus detectado em verruga de paciente portador de HIV. Barra 50 nm. 1-C: Vírus do grupo Pox em lesão de úbere de vaca (varíola bovina). Barra 200 nm.

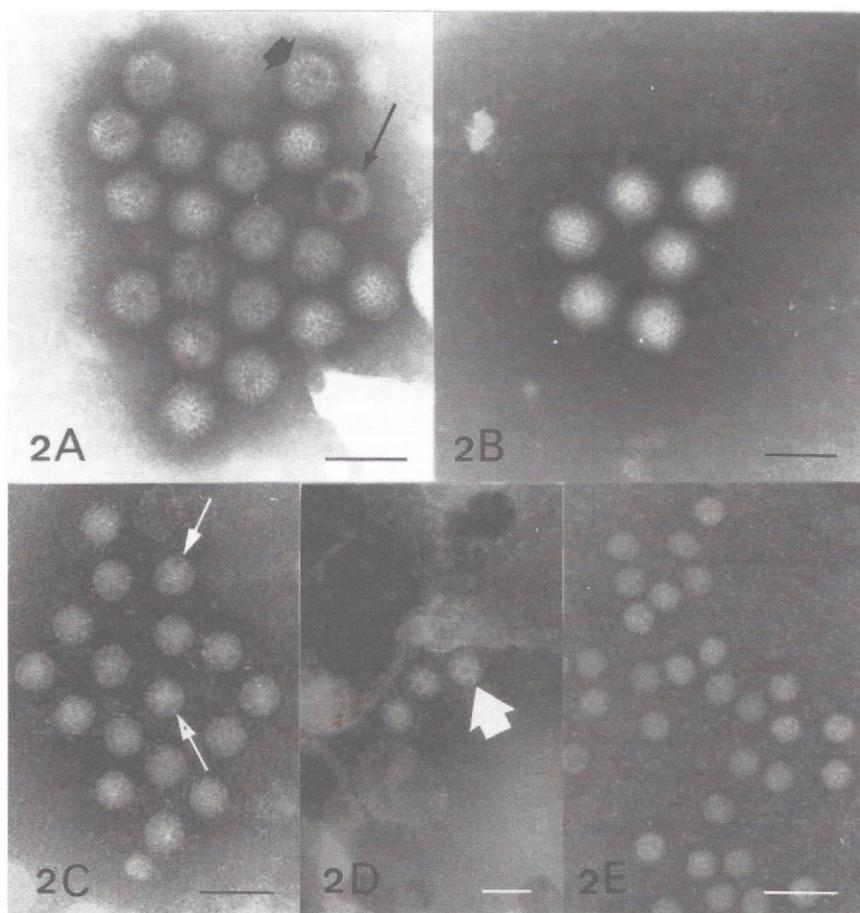


Fig. 2 - Fotomicrografias eletrônicas de vírus associados às gastroenterites.

- 2-A: Rotavírus. Aglomerado de partículas virais típicas. Partícula vazia com cápside externa ( ). Partículas completas ( ). Microscopia Eletrônica Direta. Barra 100 nm.
- 2-B: Adenovírus. Partículas virais com morfologia icosaédrica apresentando nítidos capsômeros. Microscopia Eletrônica Direta. Barra 100 nm.
- 2-C: Aglomerado de Astrovírus. A seta ( ) aponta partícula com morfologia típica de formato de estrela com 5 ou seis pontas. Microscopia Eletrônica Direta. Barra 50 nm.
- 2-D: Calcivírus, apresentando morfologia típica de "estrela de Davi" ( ). Imunomicroscopia Eletrônica Clássica. Barra 50 nm.
- 2-E: Partículas de "Small Round Virus Particles - SRVP" de aproximadamente 22 nm. Microscopia Eletrônica Direta. Barra 50 nm.

um dos poucos meios de diagnóstico. Os Astrovírus apesar de serem liberados em grande quantidade no intestino, apresentam-se por vezes com aspecto de aglutinado viral (fig. 2-C) e morfologia característica em apenas 10 a 20%<sup>3,30</sup>, portanto, nem sempre é detectado na forma característica de estrela de 5 ou 6 pontas, dificultando o diagnóstico. Quanto aos Calcivírus (fig. 2-D), apesar da morfologia viral peculiar de "estrela de David"<sup>31</sup>, sua detecção torna-se difícil pelo seu tamanho e pequena quantidade presente na amostra.

São considerados "Small Round Virus Particles - SRVP"<sup>6, 23,25</sup> as partículas virais de dimensão entre 20

e 35 nm (fig. 2-E) encontradas em amostras fecais diarreicas e que não são possíveis de serem identificados morfologicamente. Na tentativa de se identificar os "SRVP", submete-se as amostras positivas à IME, utilizando-se anti-soros específicos (Anti-Astrovírus, Anticalcivírus e Antinorwalk), com isto aumentando-se a sensibilidade diagnóstica<sup>25</sup>.

O vírus da Hepatite A (fig. 3), que eventualmente pode ser detectado pela microscopia eletrônica em amostras fecais, é identificado através da IME utilizando anticorpo específico<sup>10</sup>. A dificuldade neste caso particular reside na obtenção de amostras positivas, pois quando há descarga viral nas fezes o paciente ainda está assintomático.

Apesar de não ser o método de escolha, a M.E. serve de apoio diagnóstico nos casos em que existam falta de insumos básicos, como é o caso de detecção de "Parvovírus-like" em soro ou urina concentrada de pacientes com suspeita de eritema infeccioso<sup>43</sup>.

No IAL a microscopia eletrônica direta (MED) não tem sido utilizada para fins de diagnóstico dos

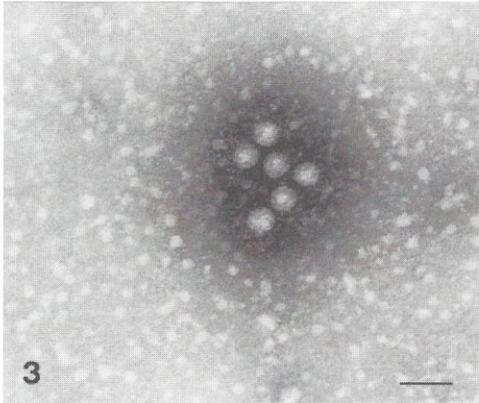


Fig. 3 - Fotomicrografia eletrônica de vírus da Hepatite-A. Imunomicroscopia Eletrônica Clássica. Barra 50 nm.

Ortomixovírus e Paramixovírus, embora alguns autores citem o emprego desta técnica<sup>11,22</sup>. A existência de testes de escolha mais práticos e menos onerosos como imunofluorescência e ELISA, somada à excessiva presença de muco no material de origem, torna a MED menos indicada<sup>1</sup>; apesar destes vírus serem freqüentemente analisados por coloração negativa para controle morfológico da produção e purificação de antígenos virais (figs. 4-A e 4-B).

A experiência nos mostra que os vírus com envoltório devem ser manipulados com extremo cuidado, para evitar rompimentos dos respectivos envoltórios e liberação do ácido nucléico (fig. 5-A e 5-B1). Por vezes, as espículas também podem ser perdidas, pela sua labilidade, alterando a sua morfologia (Figs. 5-A e 5-B2) e dificultando a identificação<sup>1</sup>. Em alguns vírus com nucleocapsídeos helicoidais, como o vírus do sarampo (fig. 4-B), é interessante que algumas partículas estejam rompidas para permitir a saída dos nucleocapsídeos e facilitar a identificação<sup>24</sup>. Entretanto, na análise do purificado de antígenos de superfície do vírus da hepatite-B (AgHBs) essa dificuldade em questão não ocorre, pois gativo enquanto a MED detectará a presença de

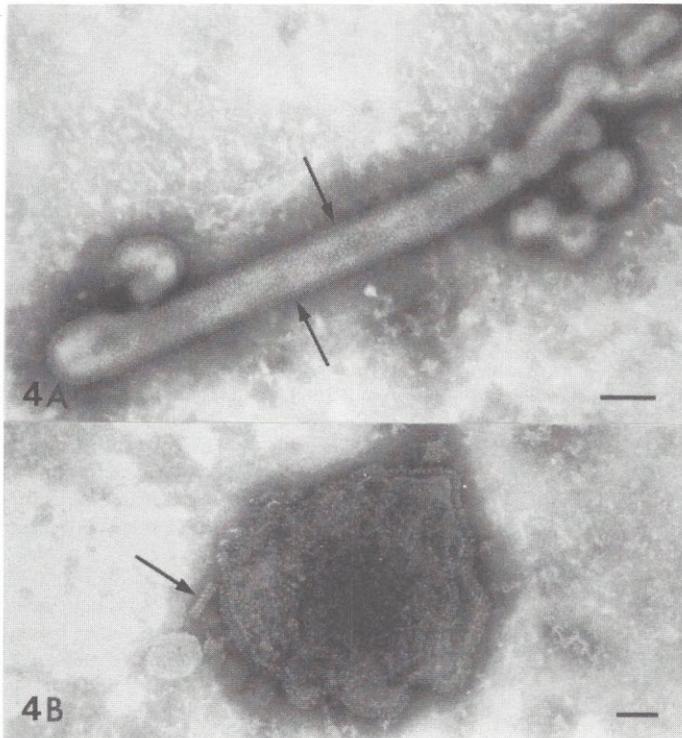


Fig. 4 - Fotomicrografias eletrônicas de:

4-A: Vírus Influenza (Ortomixovírus), apresentado nas formas pleomórficas, com suas espículas características no seu envoltório ( ). Microscopia Eletrônica Direta. Barra 100 nm.

4-B: Vírus do Sarampo (Paramixovírus). Partícula com envoltório parcialmente rompido com liberação dos nucleocapsídeos ( ). Microscopia Eletrônica Direta. Barra 50 nm.

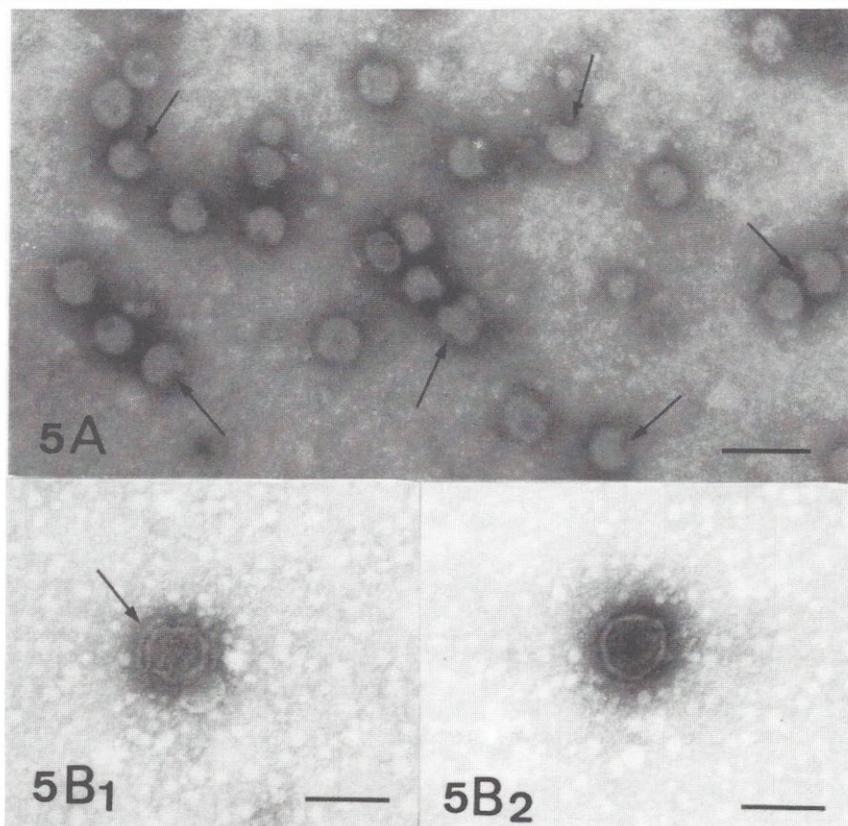


Fig. 5 - Fotomicrografias eletrônicas de:

5-A: Vírus Rocio (SPH-34675) causador de encefalite humana. Purificado viral a partir de encéfalo de camundongo experimentalmente inoculado. Algumas partículas apresentam-se rompidas e sem espículas do envoltório ( ). Microscopia Eletrônica Direta. Barra 100 nm.

5-B: Vírus HIV (co-cultivo em linfócitos). Microscopia Eletrônica Direta:

5B1 - Partícula viral apresentando espículas típicas em seu envoltório ( ). Barra 100 nm.

5B2 - Partícula com envoltório viral sem suas espículas. Barra 100 nm.

as partículas são esféricas (em torno de 22nm) ou tubulares (fig. 6) bem característicos<sup>8</sup>.

Em 1983, ocorreu na cidade de São Paulo um surto de meningite asséptica, que atingiu pessoas de várias faixas etárias, sendo isolado do líquido desses pacientes um provável novo vírus. Foram detectadas partículas semelhantes a vírus com diâmetro em torno de 40 nm no sobrenadante de cultura celular infectado, ressaltando-se aqui a importância dos resultados obtidos pela ME<sup>42</sup>.

Os nossos resultados com 30,22% de positividade, apresenta uma baixa sensibilidade. A M.E. é geralmente citada como a 3ª na lista de sensibilidade, abaixo dos testes de radioensaio e ensaios imunoenzimáticos<sup>1</sup>. Porém, essa baixa sensibilidade é relativa, pois na realidade a ME e os testes imunoenzimáticos deveriam ser considerados como complementares. Por exemplo, uma amostra fecal diarréica contendo Adenovírus, sendo analisada por ensaio imunoenzimático dirigido para Rotavírus do Grupo A e por MED, o resultado do ensaio enzimático será ne-

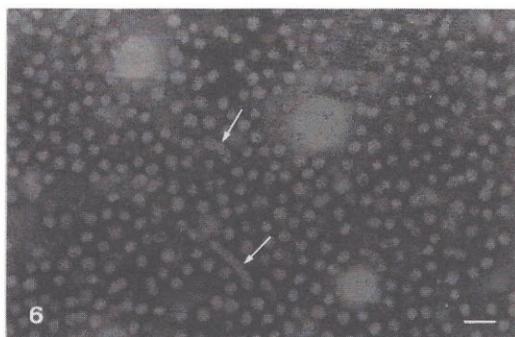


Fig. 6 - Fotomicrografia eletrônica de um purificado de antígeno HBs (vírus da Hepatite-B), apresentando formas esféricas e algumas alongadas ( ). Microscopia Eletrônica Direta. Barra 50 nm.

gativo enquanto a MED detectará a presença de partículas com morfologia de Adenovírus. A MED é ainda a única que permite detectar mais de um agente numa mesma amostra (fig.7).

Apesar da MED depender da interpretação individual do técnico especializado, tornando-a subjetiva, dificultando a avaliação de sua sensibilidade e aliada à impossibilidade de se realizar exames em larga escala, é uma técnica de fácil execução, com a vantagem de se obter resultados rápidos usando pouca amostra biológica. Não devemos esquecer também o alto custo operacional.

Embora os grandes centros de pesquisas e hospitais em países desenvolvidos mantenham laboratórios de microscopia eletrônica realizando diagnós-

tico rápido de vírus voltados às doenças de etiologias virais, no nosso país esta atividade ainda é restrita.

Tendo-se em mente a existência de vários laboratórios de ME voltados a atendimento da saúde humana, porém mais voltados para a pesquisa, este trabalho foi escrito com o intuito de divulgar a nossa experiência e incentivar a formação de técnicos especializados nesta área.

#### AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos às estagiárias da Seção de Microscopia Eletrônica, Elizabeth A. Ferreira e Rosemeire R. Santana, pela realização de parte das colorações negativas deste trabalho.

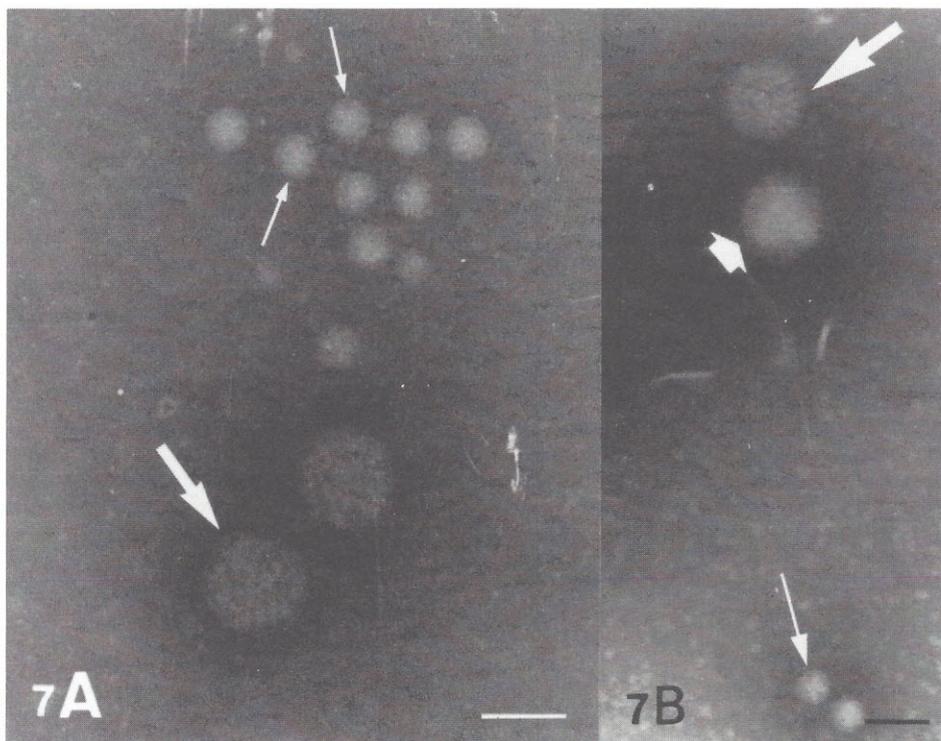


Fig. 7 - Fotomicrografias eletrônicas apresentando detecções de mais de um vírus numa mesma amostra de fezes diarréicas. Microscopia Eletrônica Direta.

7-A: Rotavírus ( ) e Astrovírus ( ). Barra 50 nm.

7-B: Rotavírus ( ), Adenovírus ( ) e Astrovírus ( ). Barra 50 nm.

UEDA, M.; TANAKA, H.; KISIELIUS, J. J.; JOAZEIRO, P. P.; WEIGL, D.R. - Rapid vírus diagnoses by electron microscopy. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 55(2):57-65, 1995.

ABSTRACT: The Electron Microscopy Section of Adolfo Lutz Institute performs rapid virus diagnosis in clinical specimens such as: vesicle fluid, scrapies lesions, saliva and urine (Herpesvirus group), skin lesions (Papilloma virus, Poxvirus group), diarrhoeal samples (Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus, Calicivirus, Small Round Virus Particles-SRVP, Norwalk agent, Parvovirus and Coronavirus) and water's analysis (bacteriophages). It contributes too, in the morphologic quality control of virus antigens analysing samples of Measle, Influenzae, Rocio, Dengue, Hepatite A and B, HIV, and others. Negative staining is one of the techniques for viruses diagnosis in human diseases. Morphology, sub-structure and shape are important features for differentiation of the viruses. In spite of high cost, need of specialized technicians and impossibility to carry out analysis of great scale, the negative staining is an easy and rapid method, and it uses little quantity of biological specimens. It is useful to detect viruses that are difficult to cultivate *in vitro* such as several viruses associated with gastroenteritis in humans, and its advantage is only one that allows to observe two or more agents in the same specimen. Although, there are some Electron Microscopy Laboratories at Universities and Research Institutions, each laboratory have its own researchs and a few laboratories accomplish the rapid virus diagnosis.

DESCRIPTORS: Electron microscopy, Negative staining, Virus, Diagnosis

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J.D. Uses and abuses of diagnostic electron microscopy. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.*, **104**: 147-58, 1983.
2. ALMEIDA, J.D. & WATERSON, A.P. The morphology of vírus - antibody interaction. *Adv. Virus Res.*, **15**:307 - 38, 1969.
3. ASHLEY, C.R. et alii. Astrovirus-associated gastroenteritis in children. *J. Clin. Pathol.*, **31**: 939-43, 1978.
4. BARTH, O.M. Estudos sobre a contrastação negativa de suspensões virais. *Rev. Brasil. Biol.*, **44**: 71-80, 1984.
5. BRENNER, S. & HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of víruses. *Biochim. Biophys. Acta.*, **34**: 103-10, 1959.
6. CAUL, E.O. & APPLETON, H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal víruses: an interim scheme for classification. *J. Med Virol.*, **9**: 257-65, 1982.
7. CRUICKSHANK, J.G. et alii. Electron microscopy in the rapid diagnosis of small pox. *Lancet* **ii**, 527, 1966.
8. DANE, D.S. et alii. Vírus-Like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, **ii**:695-8, 1970.
9. DERRICK, K.S. Quantitative assay for plant víruses using serologically specific microscopy. *Virology*, **56**: 652-3, 1973
10. DIENSTAG, J.L. et alii. Quantitation of antibody to hepatitis A antigen by immune electron microscopy. *Infect. Immun.*, **13**: 1209-13, 1976.
11. DOANE, F.W. et alii. Rapid laboratory diagnosis of paramyxovirus infection by electron microscopy. *Lancet* **ii**, 751, 1967.
12. DOANE, F.W. et alii. Application of electron microscopy to the diagnosis of virus infections. *Can. Med. Ass. J.*, **100**: 1043-9, 1969.
13. DOANE, F.W. & ANDERSON, N. *Electron microscopy in diagnostic virology*. Cambridge University Press, 1987.
14. DOLIN, R. et alii. Novel agents of viral enteritis in humans. *J. Infect. Dis.*, **155**: 365-76, 1987.
15. DONELLI, G. et al. A three-year diagnostic and epidemiological study on viral infantile diarrhoea in Rome. *Epidem. Inf.*, **100**: 311-20, 1988.
16. FIELD, A.M. Diagnostic virology using electron microscopy. *Adv. Virus. Res.*, **27**: 1-69, 1982.
17. FLEWETT, T.H. et alii. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, **2**: 1497, 1973.
18. FLEWETT, T.H. et alii. Calicivirus in man (letter). *Lancet*, **ii**: 311, 1976.
19. GARDNER, P.S. Rapid Virus Diagnosis. (Review Article) *J. gen. Virol.*, **36**: 1-29, 1977.
20. GELLI, D.S. & SOUZA, A. Bacteriófagos fecais em águas, verduras cruas não lavadas e outros produtos alimentícios: observações quanto ao seu achado durante surto de hepatite infecciosa e em condição normal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **52**: 63-9, 1992.
21. GLASS, R.I. et alii. Summary of the consensus Workshop on the Electron - microscopic detection of viral agents of gastroenteritis. Center for Infectious Diseases, CDC, Atlanta - GA, USA, 1990.

22. JONCAS, J. et alii. Diagnosis of viral respiratory infection by electron microscopy. *Lancet* **i**: 956, 1969.
23. KAPIKIAN, A.Z. et alii. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, **10**: 1075-81, 1972.
24. KELLEN, A.E. & McLEOD, D.A. Differentiation of myxoviruses by electron microscopy and immunoelectron microscopy. In: Kurstak, E. & Morisset, R., eds. *Viral immunodiagnosis*. New York, Academic Press, 1974. p. 257-75.
25. KISIELIUS, J.J. et alii. Detecção por microscopia eletrônica (ME), de SRVP ("Small Round Virus Particles") em fezes de pacientes com quadros de gastroenterites. In: Encontro Nacional de Virologia, 5º São Lourenço, MG, 1990. Resumos, São Lourenço, 1990, p. 69/H49.
26. KISIELIUS, J.J. et alii. Detecção de calicivírus por microscopia eletrônica. In: *Virologia* 93. Encontro de Virologia, Abrangência Cone Sul, Porto Alegre, 1993. *Resumos*, Porto Alegre, 1993. p. 320/PO-3-19.
27. LeBARON, Ch. et alii. Viral agents of gastroenteritis - Public health importance and outbreak management. *MMWR - Recommendations and Reports - CDC*, **39**(RR-5), 1990.
28. LEITE, J.P.G. et alii. Astrovirus in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 489-90, 1991.
29. LEW, J.F. et alii. Six-year retrospective surveillance of gastroenteritis viruses identified at ten electron microscopy centers in the United States and Canada. *Pediatr. Infect. Dis.J.*, **9**: 709-14, 1990.
30. MADELEY, C.R. & COSGROVE, B.P. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. (letter) *Lancet*, **ii**: 451, 1975.
31. MADELEY, C.R. & COSGROVE, B.P. Calicivírus in man. (letter) *Lancet*, **i**: 199-200, 1976.
32. MILLER, S.E. Diagnostic virology by electron microscopy. *ASM News*, **54**: 475-81, 1988.
33. MONROE, S.S. et alii. Electron microscopy reporting of gastrointestinal viruses in the United Kingdom, 1985-1987. *J. Med. Virol.*, **33**: 193-8, 1991.
34. MOSS, B. Poxviridae and their replication. In: Fields, B.N. et alii. *Fundamental Virology*, 2nd e. New York, Ed. Raven Press, Ltd, 1991. p. 953-85.
35. NOZAWA, C.M. et alii. Detection of astrovírus-like in diarrhoeic stool and its coexistence with rotavirus. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **27**: 238-41, 1985.
36. NOYES, W.F. Structure of the human wart vírus. *Virology*, **23**: 65-72, 1964.
37. PETERS, D. et alii. Viriola die Zwierlassig der electroen mikroskopischen schnell diagnostik. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, **78**: 2240, 1962.
38. SALLES-GOMES, L.F. et alii. Varíola: diagnóstico etiológico de 1967-70, no Instituto Adolfo Lutz. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **31**: 5-12, 1971.
39. SHUKLA, D.D. & GOUGH, K.H. The use of protein-A from staphylococcus aureus in immune electron microscopy for detecting plant virus particles. *J. Gen. Virol.*, **45**: 533-6, 1979.
40. STANBRIDGE, C.M. et alii. Demonstration of papilloma virus particles in cervical and vaginal scrape material: a report of 10 cases. *J. Clin. Pathol.*, **34**: 524-31, 1981.
41. STEWIEN, K.E. et alii. Viral, bacterial and parasitic pathogens associated with severe diarrhoea in the city of São Paulo, Brazil. *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, **11**: 148-52, 1993.
42. TAKIMOTO, S. et alii. Preliminar characterization of new vírus isolated from the spinal fluid of patients with meningitis in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **32**: 162 - 7, 1990.
43. TAKIMOTO, S. et alii. Presumptive rapid diagnosis of parvovirus infection in patients with Erythema Infectiosum-like illness. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **52**: 27-30, 1992.
44. TANAKA, H. et alii. Intrafamiliar outbreak of astrovirus gastroenteritis in São Paulo, Brazil. In: *General Meeting of the American Society Microbiology*, 91st, Dallas, Texas, USA, 1991. Abstracts, Dallas, 1991, p. 406.
45. TIMENETSKY, M.C.S.T. et alii. Rotavírus, adenovirus, astrovirus, calicivírus e "small round vírus particles" em fezes de crianças, com e sem diarreia aguda, no período de 1987 a 1988, na Grande São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **35**: 275-80, 1993.
46. UEDA, M. et alii. Diagnóstico rápido de vírus do Grupo Herpes por microscopia eletrônica: observações atípicas nas amostras de pacientes aidéticos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **51**: 57-62, 1991.

Recebido para publicação em 02/12/94

