

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

KLARISSA MIRANDA GUARINES

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE NOROVÍRUS
CIRCULANTES EM MOLUSCOS BIVALVES E HUMANOS NO NORDESTE
BRASILEIRO**

Recife
2020

KLARISSA MIRANDA GUARINES

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE NOROVÍRUS
CIRCULANTES EM MOLUSCOS BIVALVES E HUMANOS NO NORDESTE
BRASILEIRO**

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Orientador: Dr. Lindomar José Pena

Coorientadora: Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil

Recife

2020

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

G915d	<p>Guarines, Klarissa Miranda.</p> <p>Detecção e caracterização molecular de norovírus circulantes em moluscos bivalves e humanos no Nordeste brasileiro / Klarissa Miranda Guarines. – Recife: [s.n.], 2020.</p> <p>129 p. : ilus., graf.</p> <p>Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.</p> <p>Orientador: Lindomar José Pena; coorientadora: Laura Helena Vega Gonzales Gil.</p> <p>1. Bivalves. 2. Norovírus. 3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. 4. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala. I. Pena, Lindomar José. II. Gil, Laura Helena Vega Gonzales. III. Título.</p>	CDU 578
-------	--	---------

KLARISSA MIRANDA GUARINES

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE NOROVÍRUS
CIRCULANTES EM MOLUSCOS BIVALVES E HUMANOS NO NORDESTE
BRASILEIRO**

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Aprovado em: 17/03/2020

BANCA EXAMINADORA

Dr. Lindomar José Pena (Orientador)
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Marli Cordeiro Tenório (Titular interno)
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Gabriel da Luz Wallau (Titular interno)
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Heidi Lacerda Alves da Cruz (Titular externo)
Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva/Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (Titular externo)
Laboratório Central do Centro de Biociências/Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho à minha família
e à Klarissa criança, que tinha o sonho de ser cientista.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por tudo que me foi concedido nesses quatro anos de doutorado. Para mim, ser cientista é ter a certeza que a ciência explica quase tudo, pois existe uma força inexplicável maior que todos nós, e é a fé nessa força que nos permite caminhar com a certeza que tudo dá certo no fim. Sou grata por ter tido a chance de evoluir, espero que tenha conseguido dar o meu máximo nessa missão.

Gostaria de agradecer à minha família, base de tudo que sou. Fazer uma pós graduação é algo que exige muito do aluno, e nem todos aguentam. O mesmo se estende à família, que precisa de muito amor para aguentar se fazer presente nos momentos bons e ruins. Agradeço à minha mãe Cárley Barza, razão da minha existência. Não existem palavras para descrever a mulher incrível e empoderada que é, capaz de tudo pelas filhas. De personalidade única, ela é digna de respeito e admiração infinitos. Quem conhece sabe o ícone que é essa mulher. Agradeço à minha irmã Gabi, que me ensinou o sentido do amor desde seu nascimento. O companheirismo que temos supera todas as barreiras das nossas diferenças, e tenho certeza que assim será até o fim. Obrigada por sempre estar disponível quando precisei. Obrigada minha tia e madrinha Bi por todo suporte além da vida acadêmica e tio Gustavo, e ao meu primo João amor de nossas vidas, a pessoa de coração mais puro e carinhosa que conheço. A bondade pode sim vencer. Agradeço também ao meu noivo Felipe, que esteve comigo desde as aflições iniciais do TCC, passando pela dissertação e agora pela tese. Equilibrados como todos os opostos, nossas diferenças nos atraem e unem ainda mais. Obrigada por tudo nos momentos em que eu estava mais chata e ansiosa do que já naturalmente sou. Amo vocês.

Agradeço imensamente à Dra Marli Tenório por me apresentar ao meu orientador Dr Lindomar Pena e pela colaboração no nosso projeto inicial. A senhora é um exemplo a ser seguido, admirada por todos nós. Agradeço também à Dra Laura Gil pela orientação e por todos os ensinamentos transmitidos, um exemplo de cientista que me orgulho de conhecer.

Dr Lindomar possuía um projeto com financiamento aprovado, mas sem ninguém para executar. Eu queria fazer doutorado, mas não tinha projeto nem orientador. E assim nos conhecemos. Gostaria de agradecer pela confiança no meu trabalho, o que me fez desenvolver e executar os projetos com muito afinco. Obrigada pela orientação, Lindomar, ainda que às vezes inconsciente. Nesses quatro anos, aprendi mais do que o senhor imagina. Aprendi a ser independente, ter ideias, pensar como um revisor, fazer leitura crítica, ter paciência, uma lista de inúmeras coisas que o senhor me passou. Obrigada por fornecer estrutura e subsídios para que eu desenvolvesse essa tese, e por coordenar o nosso grupo de pesquisa. Obrigada por toda

dedicação a mim, apoio nos momentos mais delicados e tranquilidade nos momentos mais conturbados.

Agradeço ao Instituto Aggeu Magalhães, por fornecer a melhor estrutura possível para o desenvolvimento dos meus projetos. Orgulho de fazer parte dessa instituição há 10 anos e de poder ter contribuído para criação de algo novo aqui. Agradeço ao Núcleo de Plataforma Tecnológica, representado por Cássia e Viviane, onde pude realizar os experimentos de PCR em tempo real e Sequenciamento. Agradeço pela disponibilidade de carros para o trabalho de campo e aos motoristas, especialmente Seu Marcos e Seu Ezequiel, que me acompanharam durante as coletas. Aproveito para agradecer a todos os colegas do LAVITE que foram às praias catar os moluscos comigo. Não citarei os nomes para não correr o risco de esquecer alguém, pois foram muitos que toparam me acompanhar nas aventuras. Obrigada, sem vocês seria muito mais difícil! Obrigada também à toda equipe do LAVITE, que me acolheu no meu recomeço em um novo departamento. Agradeço a todos os funcionários da recepção do IAM, da secretaria acadêmica, da direção, vigias, do LAVITE e da limpeza por manterem o meu local de trabalho extremamente agradável.

Agradeço à FACEPE, à CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro. Agradeço também ao LACEN/PE, pela parceria estabelecida durante o desenvolvimento dessa tese e disponibilização das amostras biológicas utilizadas em parte desse projeto.

Gostaria de agradecer também ao meu grupo de pesquisa, o Lindo Team, por todo apoio. Ter uma equipe para dividir os perrengues é essencial em nosso meio, e certamente todos que passam em minha vida deixam algum ensinamento. Então agradeço a todos: Adalúcia, Bárbara, Carol Targino, Jefferson, Jurandy, Paulo André, Poli, Rafael, Renata e Willy. Um agradecimento especial para o professor Jurandy, meu supervisor no estágio à docência e, mais que isso, meu amigo há muitos anos. Seu jeito sonhador e seu amor pelo ensino são inspiradores!

Um agradecimento ainda mais especial para minha aluna Renata Pessôa. Minha dupla de norovírus que se tornou meu braço direito na aventura que é começar algo desconhecido. Sou muito feliz em fazer parte da sua vida e formação acadêmica, mas ainda mais por ter alguém que sei que posso contar em todos os momentos, científicos ou não. Torço para que você nunca desista de buscar o que lhe faz feliz, e que nunca se contente com pouco. Corra atrás sempre mais!

Quem tem amigo tem tudo! E sou muito grata por ter pessoas em minha vida que posso chamar de amigos há muito tempo, como meus amigos do colégio NAP, amigos da graduação em Biomedicina/UFPE e as tuberculettes e agregados, que participaram da minha formação

inicial e me ensinaram mais do que muitos professores. Muito obrigada! Mas novos amigos também se tornam especiais mesmo que com menos tempo. Tenho um grupo de suporte incrível ao meu redor, o qual tenho uma admiração e amor imensuráveis, e por isso agradeço. Obrigada Carol Simões, Fábria, Jefferson/Biu, Poli, Renata e Vanessa por serem uma das melhores coisas que esse doutorado me deu. Sem vocês certamente essa missão seria impossível. Amo vocês, amigo estou aqui!

E por falar em presentes que o doutorado me deu, não poderia finalizar sem agradecer às minhas rainhas Marjorie, Morganna e Tâmisa. Sempre me questiono como quatro pessoas tão diferentes podem se identificar e amar tanto. Mas novamente trago o equilíbrio dos opostos. Vocês são incríveis, as melhores companheiras de ciência que eu poderia ter. Cientistas brilhantes e que tenho muito orgulho. Se eu acreditasse que sou metade do que vocês dizem que sou, certamente eu dominaria o mundo! Nos meus momentos mais desesperadores, nos desabafos muitas vezes pelo WhatsApp devido à correria das nossas vidas, vocês foram essenciais em me acalmar. Especialmente na fase final que passou de quase surto, sensação de vazio, ansiedade até o alívio, em exatamente todos os momentos vocês me deram apoio, e em todas as decisões que tomei me incentivaram. Por isso sou eternamente grata!

Por fim, agradeço à minha psicóloga Alice Pacífico, que conheci no último ano do meu doutorado. Sempre com medo, finalmente enfrentei e decidi iniciar a terapia, pois sabia que esse ano decisivo seria mais pesado que os outros. E apesar de ter muitas coisas na minha vida para serem resolvidas, passei o ano inteiro praticamente falando da pós graduação. Obrigada pela paciência em ouvir meu descarrego de informações e palavras, e pela ajuda que me deu permitindo que eu chegasse até aqui. Cuidar da mente e do corpo é algo que tendemos a esquecer, mas sou muito feliz e grata por ter me permitido cuidar de mim, além de tudo e de todos. Por isso agradeço também aos instrutores de yoga que conheci no primeiro ano de doutorado, me apresentando a uma prática que me ajudou demais até o último momento. E aos instrutores da minha academia, sempre felizes e dispostos a me ajudar a cuidar do meu lar, meu corpo.

De maneira mais que clichê, eu sou só gratidão!

GUARINES, Klarissa Miranda. **Detecção e caracterização molecular de norovírus circulantes em moluscos bivalves e humanos no Nordeste brasileiro**. 2020. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

RESUMO

O norovírus (NoV) é o principal agente etiológico de surtos de gastroenterites no mundo. Estima-se que 15% dos surtos de NoV são causados por alimentos contaminados, dentre os quais os moluscos bivalves têm especial importância. Trata-se de um vírus geneticamente diverso e o monitoramento de sua distribuição e variabilidade genética é de extrema importância. O objetivo desse trabalho foi mapear, de maneira inédita, a distribuição do NoV nos litorais Paraibano e Pernambucano, além de caracterizar molecularmente as cepas de NoV circulantes na região. Para isso, foram realizadas coletas de moluscos bivalves na Paraíba (PB) e em Pernambuco (PE). Para o processamento, os moluscos foram lavados e tiveram a porção correspondente ao divertículo gástrico pesada e tratada com proteinase K 100µl/ml em igual volume. Foram coletadas também amostras de fezes de humanos sabidamente acometidos com NoV. O RNA foi extraído dessas amostras utilizando-se kit comercial e a detecção viral foi realizada por uma nova RT-qPCR padronizada usando *primers* específicos. Para sequenciamento, as amostras foram amplificadas por PCR convencional após transcrição reversa, utilizando-se iniciadores desenhados nesse estudo. Foram coletados 1880 moluscos, sendo 1000 mariscos, 560 ostras e 320 sururus. Após processamento e extração, essas amostras resultaram em 463 RNAs que foram submetidos à RT-qPCR. Todas as amostras foram negativas. Em relação às amostras de humanos, foram coletadas 21 amostras de pacientes positivos para NoV, as quais foram sequenciadas usando Sequenciamento de Nova Geração (NGS) ou Sanger. As características clínicas desses pacientes também foram analisadas. O genótipo de NoV mais encontrado foi o GII.Pe-GII.4. A ausência do vírus em amostras de moluscos já foi relatada em outros países. A epidemiologia molecular e os estudos de vigilância da diversidade genética dos NoV devem continuar para monitorar a emergência e prevalência de novas cepas e estabelecer os padrões de transmissão.

Palavras chave: Bivalves. Norovírus. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala.

GUARINES, Klarissa Miranda. **Detection and molecular characterization of norovirus in bivalve mollusks and humans in Northeast Brazil**. 2020. Thesis (Doctorate in Biosciences and Biotechnology in Health) –Aggeu Magalhães Institute, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

ABSTRACT

Norovirus (NoV) is the main cause of gastroenteritis outbreaks in the world. It is estimated that 15% of NoV outbreaks are caused by contaminated food, of which bivalve mollusks are of particular important because of their bioaccumulation capacity. NoV is a genetic diverse virus, and surveillance of its distribution and variability is extremely important. The aim of this work was to map, for the first time, the distribution of the NoV in the Paraíba (PB) and Pernambuco (PE) coastal region and carry out the molecular characterization of NoV strains. For this, bivalve mollusks were collected in PB and PE. For processing, the mollusks were washed and had the portion corresponding to the gastric diverticulum dissected and weighted and then treated with 100 µl/ml proteinase K in equal volume. Human samples from patients with confirmed NoV infection were also collected. RNA from these samples was extracted and NoV presence was detected by a new RT-qPCR standardized using specific primers. For sequencing, samples were amplified through conventional PCR after reverse transcription, using primers designed in this study. From all cities from PB and PE, 1880 mollusks were collected: 1000 shellfish, 560 oysters and 320 mussels. After processing and extraction, these samples resulted in 463 RNAs that were submitted to RT-qPCR. All samples were negative. From human, 21 positive NoV samples were collected and sequenced by either Next Generation Sequencing (NGS) or Sanger. Clinical features of the patients were also analyzed. The most prevalent genotype was GII.Pe-GII.4. The absence of the virus in mollusk samples has been reported in other countries. Molecular epidemiology and surveillance of NoV genetic diversity should continue to monitor new strains emergence and prevalence, and also establish transmission patterns.

Key words: Bivalves. Norovirus. Real-time polymerase chain reaction. High-Throughput Nucleotide Sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Partículas do HuNoV visualizadas através de microscopia eletrônica....	20
Figura 2	Organização do genoma do norovírus.....	23
Figura 3	Filogenia do norovírus.....	24
Figura 4	Estrutura do capsídeo do norovírus.....	25
Figura 5	Entrada do NoV na célula hospedeira.....	26
Figura 6	Replicação do NoV na célula hospedeira.....	27
Figura 7	Gráfico gerado durante a amplificação na PCR em tempo real.....	36
Figura 8	Principais metodologias utilizadas na PCR em tempo real.....	37
Figura 9	Etapas do sequenciamento de nova geração.....	39
Figura 10	Sequenciamento de nova geração do Illumina.....	40
Figura 11	Mapa do litoral Pernambucano.....	43
Figura 12	Ostras coletadas no estudo.....	45
Figura 13	Sururus coletados no estudo.....	45
Figura 14	Mariscos coletados no estudo.....	45
Figura 15	Interior de uma ostra.....	46
Figura 16	Municípios litorâneos de PE visitados para coleta.....	57
Figura 17	Locais de coleta dos moluscos, quantidade coletada e estação do ano....	58
Figura 18	Informações sobre a coleta e dados demográficos da região.....	59
Figura 19	Municípios da PB visitados para coleta	60
Figura 20	Locais de coleta dos moluscos e quantidade coletada em cada localidade	61
Figura 21	Estado do molusco no momento da coleta.....	62
Figura 22	Confirmação da clonagem de NoV GI por PCR de colônia.....	63
Figura 23	Confirmação da clonagem de NoV GII por PCR de colônia.....	63
Figura 24	Padrão de bandas esperadas para a digestão enzimática de NoV GI e GII.....	64
Figura 25	Confirmação da clonagem de NoV GI por digestão enzimática.....	64
Figura 26	Confirmação da clonagem de NoV GII por digestão enzimática.....	64
Figura 27	Amplificação da curva padrão de NoV GI.....	66
Figura 28	Curva padrão de NoV GI.....	66

Figura 29	Amplificação da curva padrão de NoV GII.....	67
Figura 30	Curva padrão de NoV GII.....	67
Figura 31	Resultados da RT-qPCR do <i>spike</i> realizado em ostras.....	68
Figura 32	RT-qPCR de algumas amostras de moluscos bivalves	69
Figura 33	Características clínicas dos pacientes do estudo.....	70
Figura 34	Estado vacinal dos pacientes do estudo.....	71
Figura 35	Profundidade do NGS do genoma completo de NoV.....	72
Figura 36	Árvore filogenética dos NoV circulantes em PE.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Proteínas codificadas pelo NoV e suas funções.....	23
Quadro 2	<i>Primers</i> utilizados no estudo para detecção de NoV GI e GII.....	48
Quadro 3	<i>Primers</i> utilizados no sequenciamento do genoma completo de NoV GII..	53
Quadro 4	Genótipos de NoV GII circulantes em PE.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
BLASTn	Ferramenta básica de alinhamento de nucleotídeos – <i>Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cDNA	DNA complementar – <i>complementary DNA</i>
CPRH	Agência Estadual de Meio Ambiente
COMPESA	Companhia Pernambucana de Saneamento
Ct	Ciclo que cruza o limiar – <i>Cycle threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico – <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados – <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
ddNTPs	Didesoxirribonucleotídeos – <i>Dideoxynucleotides</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática – <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
g	Grama
GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
HAV	Vírus da hepatite A – <i>Hepatitis A virus</i>
h	Hora
HBGAs	Ags do grupo sanguíneo – <i>Histo-blood group antigens</i>
HuNoV	Norovírus humano – <i>Human norovirus</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
Ig	Imunoglobulina
kb	Kilobases
km	Quilômetros - <i>kilometer</i>
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública “Dr Milton Bezerra Sobral”
LAVITE	Departamento de Virologia e Terapia Experimental
LB/Amp	Meio de cultura Luria-Bertani broth acrescido do antibiótico ampicilina
M	Molar
µg	Micrograma

MgCl₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
min	Minutos
NE	Nordeste
NGS	Sequenciamento de nova geração – <i>Next generation sequencing</i>
nm	Nanômetro
NoV	Norovírus
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
ORF	Sequência aberta de leitura – <i>Open reading frame</i>
PB	Paraíba
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Pernambuco
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico – <i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA de interferência
RNA_m	RNA mensageiro
rNTPs	Ribonucleotídeos fosfatados
rpm	rotações por minuto
RT	Transcrição reversa – <i>Reverse transcription</i>
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de PCR em tempo real
s	Segundo
V	Volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL.....	20
2.1 HISTÓRICO.....	20
2.2 NOROVÍRUS.....	22
2.2.1 Classificação e organização.....	22
2.2.2 Ligação às células hospedeiras.....	25
2.2.3 Entrada e replicação na célula hospedeira.....	26
2.3 EPIDEMIOLOGIA.....	28
2.4 TRANSMISSÃO E PREVENÇÃO.....	29
2.4.1 Transmissão via moluscos bivalves.....	30
2.5 DOENÇA.....	31
2.6 DETECÇÃO VIRAL E DIAGNÓSTICO.....	32
2.6.1 Isolamento viral.....	32
2.6.2 Métodos imunológicos.....	33
2.6.3 Métodos moleculares.....	34
2.6.3.1 PCR e PCR em tempo real.....	34
2.6.3.2 Sequenciamento e Sequenciamento de Nova Geração.....	37
3 JUSTIFICATIVA.....	41
4 OBJETIVO GERAL.....	42
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	43
5.1 OBTENÇÃO DOS MOLUSCOS BIVALVES.....	43
5.1.1 Área de estudo – Pernambuco.....	43
5.1.2 Área de estudo – Paraíba.....	44
5.1.3 Coleta dos moluscos e espécies estudadas.....	44
5.2 PROCESSAMENTO DOS MOLUSCOS.....	46
5.3 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.....	47
5.4 SPIKE DAS OSTRAS.....	47
5.5 CONTROLES POSITIVOS.....	47
5.6 TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	48
5.7 PCR CONVENCIONAL.....	48
5.8 CLONAGEM GÊNICA.....	49
5.9 TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i>	50

5.10 RT-qPCR.....	51
5.10.1 Condições da RT-qPCR.....	51
5.10.2 Curva padrão.....	51
5.11 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE HUMANOS.....	52
5.12 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.....	52
5.13 SEQUENCIAMENTO DE SANGER.....	54
5.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	56
7 RESULTADOS.....	57
7.1 DETECÇÃO DE NOROVÍRUS EM MOLUSCOS BIVALVES EM PERNAMBUCO.....	57
7.1.1 Obtenção dos moluscos bivalves.....	57
7.1.1.1 Área de estudo.....	57
7.1.1.2 Coleta dos moluscos e espécies estudadas.....	58
7.1.2 Processamento dos moluscos e extração do RNA viral.....	59
7.2 DETECÇÃO DE NOROVÍRUS EM MOLUSCOS BIVALVES NA PARAÍBA.....	60
7.2.1 Obtenção dos moluscos bivalves.....	60
7.2.1.1 Área de estudo.....	60
7.2.1.2 Coleta dos moluscos e espécies estudadas.....	61
7.2.2 Processamento dos moluscos e extração do RNA viral.....	62
7.3 PADRONIZAÇÃO DA RT-qPCR.....	62
7.3.1 Clonagem gênica.....	62
7.3.2 RT-qPCR.....	65
7.3.2.1 Curva padrão.....	65
7.3.2.2 Spike das ostras.....	68
7.3.2.3 RNA dos moluscos.....	68
7.4 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOROVÍRUS EM AMOSTRAS DE HUMANOS.....	69
7.4.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes do estudo.....	69
7.4.2 Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	71
7.4.3 Sequenciamento de Sanger.....	72
8 DISCUSSÃO.....	75
9 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICE A – Questionário para coleta dos moluscos.....	95

APÊNDICE B – Artigo submetido na <i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i>.....	96
APÊNDICE C – Artigo publicado na <i>Journal of Medical Virology</i>.....	115
APÊNDICE D – Artigo publicado na <i>Microbiology Resource Announcements</i>	124
ANEXO A – Carta de Anuência de LACEN.....	127
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	128

1 INTRODUÇÃO

O Norovírus (NoV) é o principal agente causador de surtos de gastroenterites no mundo (BALDRIDGE *et al.*, 2016). Estima-se que, anualmente, a infecção por NoV resulte em 685 milhões de casos e 200.000 mortes mundialmente, com um impacto de 60 bilhões de dólares na economia (LI *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2017). Sabe-se que a introdução da vacina contra rotavírus tornou o NoV um agente de ainda maior impacto nos casos de diarreia no mundo. O Brasil foi o primeiro país a introduzir a vacina contra rotavírus no calendário universal de imunização dos bebês nascidos anualmente. Isso tem feito com que os NoV se tornem de 21,4% a 35% mais frequentes que o rotavírus (FERRADOR, 2016; NAKAGOMI *et al.*, 2008). Com a implementação da vacina para o rotavírus, o NoV tem assumido o posto de agente etiológico mais detectado nos casos de diarreias agudas virais no Brasil (DE ANDRADE *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2008). No país, entre 2000 e 2011, ocorreram cerca de 33 milhões de casos de diarreia notificados (MENEGUESSI *et al.*, 2015). Em Pernambuco (PE), somente no primeiro semestre de 2017, foram notificados 149.640 casos. O NoV foi o vírus mais detectado nas amostras de fezes dos pacientes doentes e o segundo principal agente etiológico responsável por essas infecções, isolado em 13,63% da amostras (LEITE, 2017).

Os NoVs são extremamente contagiosos devido principalmente à necessidade de apenas uma pequena dose viral para sua transmissão e à sua ampla diversidade genética, além de serem extremamente resistentes ao ambiente e a agentes desinfectantes. São transmitidos pela via fecal-oral e vômito-oral: de pessoa para pessoa, através de água ou alimentos contaminados e através de fômites ambientais. O maior fator de risco para transmissão da doença é o contato com uma pessoa infectada (LOPMAN, 2015; MOORE *et al.*, 2015). Os sintomas mais comuns da gastroenterite causada por norovírus são: diarreia, vômito, náuseas, dor estomacal e, menos frequentemente, febre, dor de cabeça e dores no corpo. Esses sintomas são desenvolvidos geralmente após 12 a 48 horas de exposição ao vírus e se resolvem de um a três dias (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016).

Estima-se que 15% dos surtos de NoV são causados por alimentos contaminados (LOPMAN, 2015). Essa forma de transmissão pode se dar através de pessoas infectadas que manuseiam os alimentos ou diretamente de alimentos contaminados. A transmissão através da água também é possível (CARDEMIL *et al.*, 2017). Alguns estudos têm relatado a presença de NoV e outros vírus, como o da vírus da hepatite A (HAV), em moluscos bivalves (MATHIJS *et al.*, 2012). O NoV pode contaminar águas marinhas através do descarte de esgoto da população e permanecer no ambiente marinho por vários dias. Os moluscos bivalves são

conhecidos pela sua capacidade de bioacumulação, sendo organismos filtradores dos componentes do ambiente em que vivem (HASSARD *et al.*, 2017). Assim, esses invertebrados provenientes de áreas contaminadas podem funcionar como fonte de infecção aos consumidores, principalmente se consumidos crus ou minimamente processados. Além disso, servem como organismos sentinelas para identificação do NoV.

Existem alguns métodos diagnósticos que permitem a detecção do NoV e que vêm sendo aprimorados desde sua descoberta. O método ideal para estudos virais e desenvolvimento de drogas seria o isolamento viral. Entretanto, a ausência de um sistema de cultivo celular confiável e reprodutível para os NoV humanos (HuNoVs) ainda impossibilita, em parte, o avanço científico acerca de alguns pontos sobre essa virose (COTTON *et al.*, 2017). Apesar do desenvolvimento recente de sistemas para isolamento do vírus (ETTAYEBI *et al.*, 2016; JONES *et al.*, 2014), melhorias a fim de facilitar seu uso e aumentar as reprodutibilidades ainda deverão ser feitas para permitir sua utilização pela comunidade científica, facilitando novas descobertas (BARTNICKI *et al.*, 2017). Uma alternativa para detecção do NoV – usada em várias unidades de saúde – é o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*), que permite a detecção de antígenos (Ags) dos NoV GI e GII em amostras de fezes. Entretanto as opções disponíveis no mercado têm grande variação nos valores de sensibilidade e especificidade, o que pode resultar em alguns resultados não confiáveis que precisam ser confirmados por metodologias mais sensíveis, como testes de amplificação de ácido nucleico (ROBILOTTI *et al.*, 2015).

O advento de técnicas moleculares e sua utilização para detecção dos NoV permitiram um grande avanço nos estudos sobre sua biologia e epidemiologia (MORILLO; TIMENETSKY, 2011). A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) é uma metodologia molecular vantajosa para diagnóstico do NoV e vem sendo utilizada como padrão ouro por apresentar diversas vantagens quando comparada à RT-PCR convencional (CARDEMIL *et al.*, 2017; RUPPROM *et al.*, 2017). A utilização dessa técnica permite uma detecção rápida, sensível e reprodutível do vírus. Além da detecção viral, o conhecimento de seu genoma é de extrema importância, principalmente por ser extremamente diverso geneticamente. Com a descoberta e publicação da técnica de sequenciamento (SANGER *et al.*, 1977), a busca por sequências virais cada vez mais detalhadas vem aumentando e se aprimorando. Essa descoberta vem permitindo um maior conhecimento acerca do NoV. Um dos aprimoramentos da referida técnica, o sequenciamento de nova geração (NGS), vem revolucionando a epidemiologia molecular, alterando a compreensão sobre a biologia viral e causando profundos impactos para a saúde pública. Comparado ao método

tradicional de Sanger, o NGS tem capacidade muito maior de sequenciamento e com um custo reduzido (GRADA; WEINBRECHT, 2013). Os resultados obtidos através da união da RT-qPCR para detecção de NoV em moluscos bivalves com o sequenciamento e o NGS podem fornecer dados acerca da epidemiologia e distribuição desse vírus pelo Estado de PE e da PB, avaliando a contaminação ambiental. Além disso, esse projeto também visou caracterizar molecularmente as cepas distribuídas no Estado de PE em amostras de humanos (fezes), para aumentar a contribuição para o conhecimento do NoV, das cepas circulantes e de sua distribuição na população pernambucana.

Assim, o objetivo principal deste projeto foi traçar, de maneira inédita e inovadora, o perfil epidemiológico e molecular da contaminação por NoV nas principais espécies de moluscos bivalves exploradas nos Estados de PE e da PB, bem como em amostras de fezes de humanos previamente diagnosticados em PE. Com isso, espera-se implantar uma metodologia para detecção rápida, fornecer sequências que podem funcionar como subsídios indispensáveis para o desenvolvimento de novas vacinas e antivirais e auxiliar na implantação de programas de vigilância sanitária e ambiental voltados ao controle dessa importante virose.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

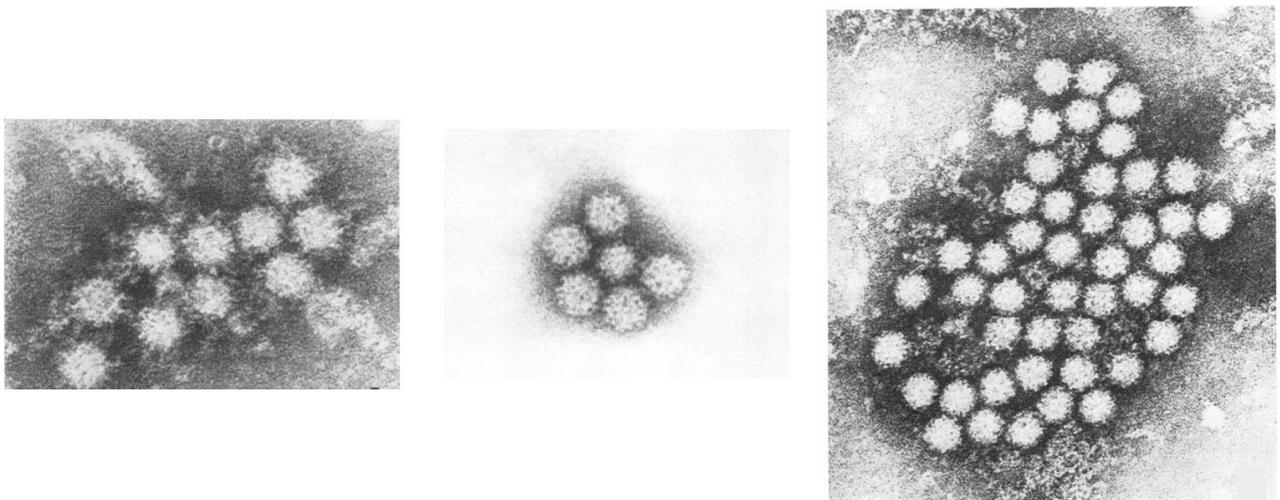
Frente à grande importância do NoV, torna-se essencial o estudo e conhecimento de diversos aspectos sobre esse patógeno. Os tópicos a seguir serão de extrema valia para o entendimento desse agente causador de gastroenterites em todo o mundo.

2.1 HISTÓRICO

Em 1929, aconteceu o primeiro relato de uma doença auto limitante caracterizada por vômito e diarreia que ocorria principalmente nos meses frios (ZAHORSKY, 1929). Pela semelhança da sintomatologia clínica, e características de prevalência da doença, acredita-se que essa tenha sido a primeira publicação acerca da norovirose, ainda que, naquela época, não se soubesse ao certo de que doença exatamente se tratava e qual seria o agente etiológico responsável por ela.

Só em 1972 o NoV viria a ser reportado pela primeira vez. Utilizando microscopia eletrônica, Kapikian *et al.* (1972) conseguiram identificar pequenas partículas, de 27-32 nanômetros (nm) de diâmetro, semelhantes ao picorna ou parvovírus (Figura 1).

Figura 1 – Partículas do HuNoV visualizadas através de microscopia eletrônica.



Fonte: Kapikian *et al.* (1972).

Nota: Aumento de 231500 vezes.

Legenda: Agregados virais observados após experimentos diversos que envolviam a incubação de um filtrado de fezes soros de voluntários ou PBS.

Em 1968, na cidade de Norwalk, Ohio, houve um surto de gastroenterite aguda de origem não bacteriana cujo agente etiológico havia permanecido desconhecido até então. Kapikian *et al.* (1972) realizaram uma série de experimentos, onde voluntários foram submetidos à ingestão de filtrados de fezes de um indivíduo do referido surto de Norwalk. Os soros convalescentes dos voluntários infectados previamente funcionaram como fonte de anticorpos (Ac) para visualização dessas partículas virais através da interação Ag-Ac por microscopia eletrônica. Eles visualizaram partículas virais menores do que todos os vírus conhecidos na época. Esse vírus causador do surto em 1968 ficou conhecido como *Norwalk virus* e é a atual cepa protótipo do gênero *Norovirus* (KAPIKIAN, 2000).

A partir daí, outras cepas de referência de HuNoV foram descobertas, como por exemplo, *Hawaii virus* (em 1977) (THORNHILL *et al.*, 1977) e *Snow Mountain virus* (em 1982) (PERRY, 1978). No início das pesquisas envolvendo NoV, na ausência de modelos animais e celulares, os voluntários humanos eram muito utilizados e muitas descobertas importantes foram feitas dessa forma. Apesar de muito útil, essa forma de obter dados é cara, demorada e requer aprovações éticas rigorosas (MOORE *et al.*, 2015). Por isso, a utilização de voluntários humanos para tais propósitos já não é mais tão comum atualmente.

A clonagem molecular do *Norwalk virus* veio a acontecer em 1990, permitindo o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas cada vez mais sensíveis e estudos sobre a biologia molecular do vírus (XI *et al.*, 1990). Com o sequenciamento e determinação da organização genômica desse vírus, foi possível observar que ele era muito similar a outros dois calicivírus e, por isso, incluíram-no na família *Caliciviridae* (JIANG *et al.*, 1993). Os NoV permaneceram por muito tempo ofuscados perante a importância de outro agente causador de diarreia aguda viral, o rotavírus. Entretanto, com o avanço das técnicas de biologia molecular, foi possível também demonstrar a associação do NoV como agente infeccioso de diversos surtos, mostrando sua distribuição no mundo e as suas rotas de transmissão. Assim, a distribuição epidemiológica do NoV passou a se tornar mais clara, e vem trazendo a real atenção para esse agente (MATHIJS *et al.*, 2012; MORILLO; TIMENETSKY, 2011).

A capacidade de cultivar os HuNoV *in vitro* permaneceu um mistério por mais de 40 anos. Em 2007, Guix *et al.* (2007) conseguiram promover um único ciclo replicativo de HuNoV em células de hepatoma humano Huh-7. Jones *et al.* (2014) conseguiram replicar esse vírus em células B, num sistema que requer, entretanto, a presença de bactérias entéricas expressando os Ags de grupo sanguíneo. Diversos grupos de pesquisa continuam tentando desenvolver, até hoje, novos métodos de isolamento viral para tornar a técnica mais aplicável, reprodutível e simples de usar (ESTES *et al.*, 2019; ETTAYEBI *et al.*, 2016; QU *et al.*, 2016).

Com o passar dos anos, o NoV continua como um agente etiológico de gastroenterites que afeta diversos indivíduos em variados locais do mundo, principalmente como consequência da globalização (BRUGGINK *et al.*, 2017; RANDAZZO *et al.*, 2018). Até os dias atuais, esses vírus representam um grande problema de saúde pública, com taxas significativas de morbidade, mortalidade e custos com os sistemas de saúde (GAYTHORPE *et al.*, 2017). Novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas e a ciência do NoV não para de buscar maneiras de auxiliar na detecção viral, imunização, no monitoramento epidemiológico e tratamento.

2.2 NOROVÍRUS

A seguir descrevemos um pouco a cerca da estrutura, classificação e replicação do NoV nas células hospedeiras.

2.2.1 Classificação e organização

O *Norovirus* é um gênero pertencente à família *Caliciviridae*, que engloba também os gêneros *Sapovirus*, *Nebovirus*, *Lagovirus* e *Vesivirus*. Os gêneros de maior importância para os seres humanos são *Norovirus* e *Sapovirus*, que causam gastroenterites agudas (GREEN, 2013). O gênero *Norovirus* engloba 10 genogrupos (GI-GX) que coincidem com cada espécie que infectam (CHHABRA *et al.*, 2019). Trata-se de um grupo diversificado de vírus não envelopados com 27-30nm de diâmetro e simetria icosaédrica (LOPMAN, 2015).

O genoma dos norovírus consiste em um RNA de fita simples de polaridade positiva com 7,4-7,7 kb. Ele é ligado covalentemente à proteína do genoma viral VPg na extremidade 5', contendo 3 ORFs e uma cauda poli A na extremidade 3'. A ORF1 codifica as seis ou sete proteínas não estruturais: a proteína amino terminal (p48 ou NS1/NS2), a nucleosídeo trifosfatase (NTPase ou NS3), a proteína semelhante à 3A (p22 ou NS4), a proteína viral ligada ao genoma (VPg ou NS5), a proteinase (Pro ou NS6) e a RNA polimerase dependente de RNA (Pol ou NS7). A ORF2 codifica a proteína estrutural viral maior VP1 e a ORF3 codifica a proteína estrutural viral menor VP2 (LI *et al.*, 2017; ROBILOTTI *et al.*, 2015). As proteínas codificadas pelo NoV e suas funções estão descritas no Quadro 1. Além do RNA do genoma completo, os calicivírus possuem um RNA mensageiro (RNAm) subgenômico de aproximadamente 2 Kb (SMERTINA *et al.*, 2019). Esse RNA subgenômico é produzido durante a replicação do NoV, se localiza co-terminalmente na extremidade 3' do RNA genômico e atua como molde para a produção de proteínas estruturais. Ele também é ligado

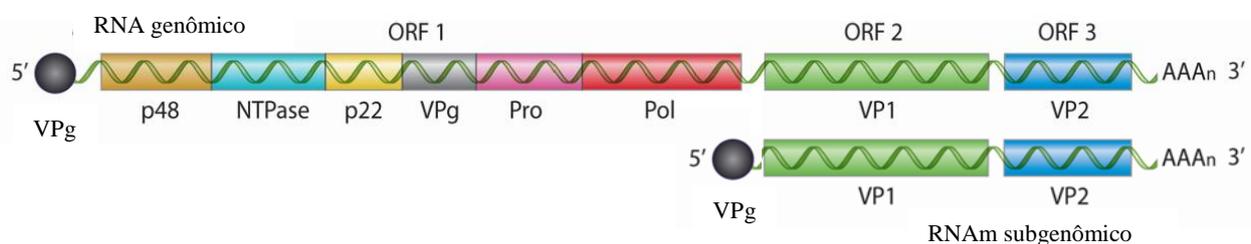
covalentemente à VPg na extremidade 5' e poliadenilado na extremidade 3', similarmente ao RNA genômico (Figura 2) (KARST, 2010).

Quadro 1 – Proteínas codificadas pelo NoV e suas funções.

Proteína	Função
NS1	<ul style="list-style-type: none"> Desconhecida
p48 ou NS2	<ul style="list-style-type: none"> Inibição do transporte de proteínas do hospedeiro para a superfície celular; Envolvida na formação do complexo de replicação?
NTPase ou NS3	<ul style="list-style-type: none"> Atividade de NTPase
p22 ou NS4	<ul style="list-style-type: none"> Inibição da secreção de proteínas do hospedeiro; Envolvida na formação do complexo de replicação?
VPg ou NS5	<ul style="list-style-type: none"> Iniciadores na replicação viral; Recrutamento de iniciadores da tradução do hospedeiro
Pro ou NS6	<ul style="list-style-type: none"> Clivagem da poliproteína da ORF 1
Pol ou NS7	<ul style="list-style-type: none"> Replicação do genoma viral; Geração da VPg uridinada
VP1	<ul style="list-style-type: none"> Principal proteína estrutural; Papel não estrutural para alguns NoVs?
VP2	<ul style="list-style-type: none"> Aumento da expressão de VP1 e estabilização da partícula viral; Recrutamento do genoma para os vírions?

Fonte: Adaptado de Karst (2010).

Figura 2 – Organização do genoma do norovírus.

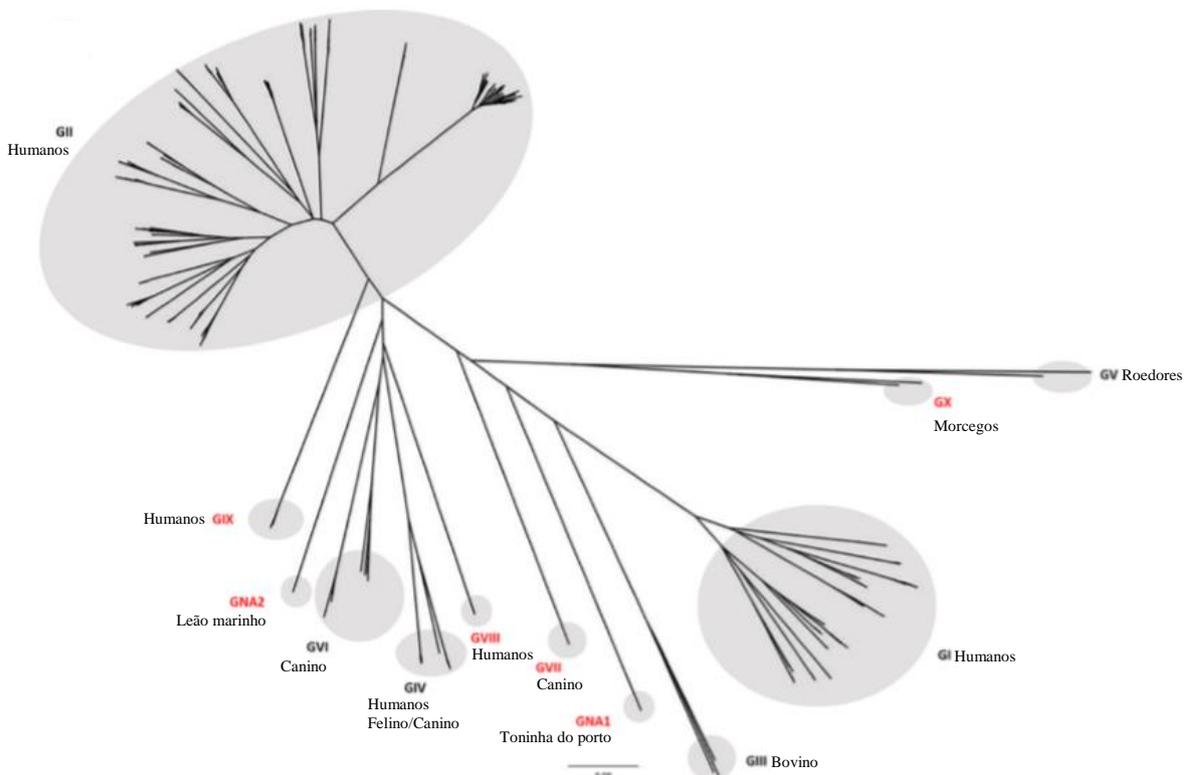


Fonte: Adaptada de Robilotti *et al.* (2015).

Legenda: Organização genômica do norovírus e seu RNAm subgenômico mostrando suas extremidades 5' covalentemente ligados à VPg (esfera preta), 3' com cauda poliA, e suas 3 ORFs. A ORF1 codifica as 6 proteínas não estruturais: proteína amino terminal (p48 ou NS1/NS2), nucleosídeo trifosfatase (NTPase ou NS3), proteína semelhante à 3A (p22 ou NS4), proteína viral ligada ao genoma (VPg ou NS5), proteinase (Pro ou NS6) e a RNA polimerase dependente de RNA (Pol ou NS7). A ORF2 codifica a proteína estrutural viral maior VP1 e a ORF3 codifica a proteína estrutural viral menor VP2.

Recentemente, em 2019, foi proposta uma atualização acerca da classificação dos genogrupos e genótipos dos NoV de acordo com as ORFs 1 e 2, reafirmando a sua alta variabilidade genética. Em uma das classificações desse estudo, com base na proteína maior do capsídeo viral VP1, o gênero é dividido em 10 genogrupos, sendo GI, GII, GIV, GVIII e GIX causadores de infecção em humanos (CHHABRA *et al.*, 2019). Desses, os genogrupos GI e GII são os mais comumente encontrados nas norovirose humanas (VINJE, 2015). Na figura 3 podemos ver a divisão dos 10 genogrupos (GI a GX) de acordo com as espécies que mais frequentemente infectam, além de mais dois gêneros propostos (GNA1 e GNA2). Os NoVs são conhecidos pela sua grande diversidade genética e circulam de maneira muito complexa na comunidade mundial. Nos últimos 40 anos, somente o genótipo GII.4, o mais comum, evoluiu e formou 7 clusters incluindo 14 variantes diferentes (BRUGGINK *et al.*, 2017; MOTOYA *et al.*, 2017).

Figura 3 – Filogenia do norovírus.



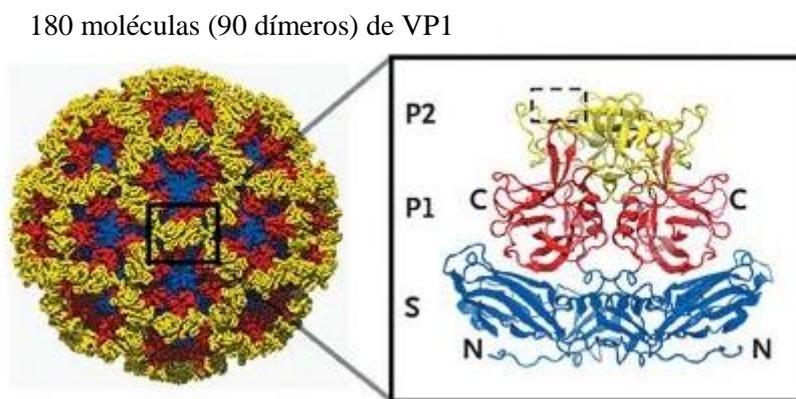
Fonte: Adaptada de Chhabra *et al.* (2019).

Legenda: Árvore filogenética mostrando a organização dos genogrupos de NoV, que se baseiam na proteína principal do capsídeo viral - VP1. Os genogrupos variam conforme hospedeiro, apesar de alguns genogrupos serem observados em mais de uma espécie.

2.2.2 Ligação às células hospedeiras

A entrada do vírus na célula é crucial para garantia do ciclo de replicativo viral e determinante para o tropismo celular, a escolha de hospedeiros, patogênese e as interações com o sistema imune (GRAZIANO *et al.*, 2019). Para o sucesso da infecção por grande parte dos microrganismos, incluindo os vírus, a ligação a glicanos da célula do hospedeiro é, usualmente, o passo mais crítico. Dentre essas moléculas, os Ags do grupo sanguíneo (HBGAs) são considerados um dos mais importantes alvos para esse patógeno. Esses Ags estão presentes nas mucosas, como a intestinal, e em suas camadas subjacentes. Sabe-se que os NoV se ligam aos HBGAs, e que o reconhecimento dessas moléculas varia de acordo com a cepa viral (HEGGELUND *et al.*, 2017). A estrutura do capsídeo viral com o domínio que se liga aos HBGAs está ilustrada na Figura 4. Os epítomos da proteína noroviral VP1, mais especificamente do domínio P2, são extremamente importantes para ligação aos HBGAs e escape do sistema imune do hospedeiro (BARCLAY *et al.*, 2019).

Figura 4 – Estrutura do capsídeo do norovírus.



Fonte: Adaptada de Glass *et al.* (2009).

Legenda: O capsídeo de NoV contém 180 moléculas de VP1, arranjadas na forma de dímeros. Cada dímero é dividido em um domínio “concha” S (do inglês *shell*) e outro “protuberante” P (do inglês *protruding*), esse último dividido em duas sub-regiões: P1 e P2. A região altamente variável do domínio P, P2, é responsável pelo reconhecimento dos HBGAs e está destacada na figura como uma caixa retangular com linhas tracejadas.

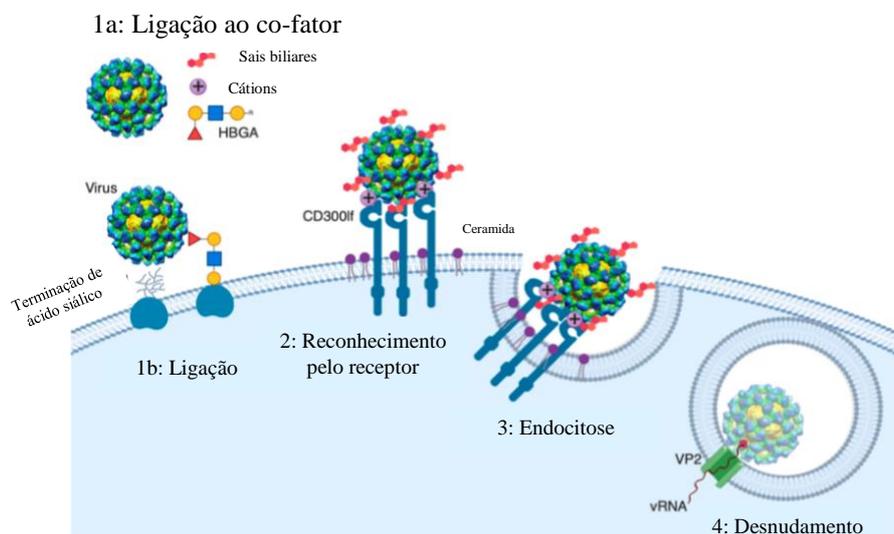
Os HBGAs são os antígenos responsáveis pela ligação e patogênese dos HuNoV mais estudados. Entretanto, existem outras moléculas capazes de desempenhar a mesma função, como os esfingolipídios (ou gangliosídios contendo ácido siálico) (ALMAND *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2014). Como já citado, diferentes cepas de NoV apresentam diferentes ligações aos HBGAs. Além disso, acredita-se que os receptores específicos desses antígenos – que variam

de acordo com o genótipo sanguíneo do indivíduo – também são importantes para o sucesso da ligação do vírus à célula do hospedeiro. Isso explicaria porque alguns indivíduos são mais susceptíveis à infecção que outros (PATEL *et al.*, 2009). Com o passar dos anos, várias mutações ocorreram no domínio P2, sugerindo um *drift* e uma evolução genética do NoV, possivelmente forçadas pela imunidade da população. Assim, podem haver, dentro de um mesmo genótipo viral, diversas variantes consolidando a circulação de um mesmo genótipo na população, como é o caso do GII.4 (GLASS *et al.*, 2009; LINDESMITH *et al.*, 2008; MALLAGARAY *et al.*, 2019). Esse é apenas mais um dos mecanismos que explicam a patogênese do NoV e destacam sua importância.

2.2.3 Entrada e replicação na célula hospedeira

Sabe-se que sais biliares e HBGAs são importantes mediadores da entrada do NoV nas células hospedeiras, porém os mecanismos moleculares exatos utilizados por essas moléculas e pelo vírus ainda não é totalmente conhecido (GRAZIANO *et al.*, 2019). Um modelo da entrada do NoV, que ocorre através de endocitose, na célula está ilustrado na Figura 5.

Figura 5 – Entrada do NoV na célula hospedeira.

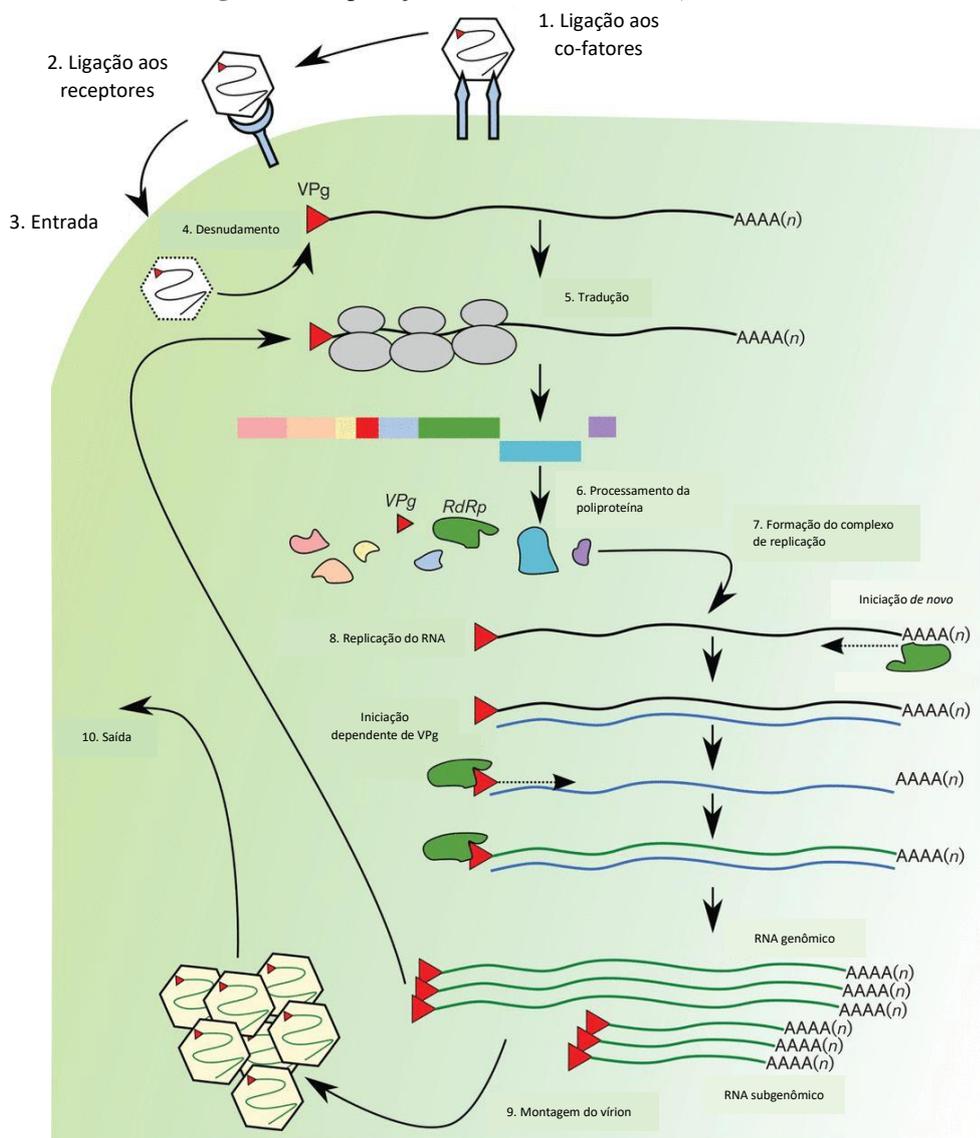


Fonte: Adaptada de Graziano *et al.* (2019).

Legenda: A primeira etapa para entrada do vírus na célula é a ligação à superfície celular. Algumas moléculas auxiliam nessa etapa, como os sais biliares, cátions bivalentes, HBGAs e glicanos com terminação de ácido siálico. A segunda etapa é a ligação a receptores. Por exemplo, o CD300lf é uma proteína de membrana contendo um domínio imunoglobulina (Ig) é o receptor para o NoV murino. O receptor para o HuNoV ainda é desconhecido. Após ligação ao receptor, o vírus é endocitado e, pelo menos para o NoV felino, a proteína do capsídeo viral VP2 forma um portal transmembrana que permite a liberação do genoma viral (vRNA na figura) para o citosol.

Após liberação do material genético viral no citoplasma celular, dá-se início o processo de replicação do seu genoma. Resumidamente, o RNA viral funciona como RNA mensageiro no citosol e é traduzido pela maquinaria do hospedeiro. Algumas das proteínas recém traduzidas interagem com a célula hospedeira para definição de sítios para replicação do genoma viral e outras funcionam como enzimas que auxiliarão nessa replicação. Em seguida, as novas fitas de RNA sintetizadas são ligadas covalentemente à VPg e empacotadas nos vírions que serão liberados após lise celular. Isso ocorre de maneira rápida, apenas horas após a infecção (GREEN, 2013). Todos esse processo está ilustrado na Figura 6.

Figura 6 – Replicação do NoV na célula hospedeira.



Fonte: Adaptada de Thorne e Goodfellow (2014).

Legenda: Após entrada do NoV na célula hospedeira e liberação do seu genoma, o RNA viral é traduzido após interação da VPg 5' terminal (triângulo vermelho) e a maquinaria celular. Inicialmente é traduzida a ORF1, poliproteína que em seguida é clivada pela protease viral NS6. O complexo de replicação é formado e a replicação ocorre através de um intermediário de RNA negativo, onde o RNA genômico e o subgenômico são sintetizados pela RdRp (NS7), usando tanto o mecanismo *de novo* quanto dependente de VPg. Em seguida há montagem do vírus na proteína do capsídeo VP1 e saída da célula.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

O NoV é responsável por 18% dos casos de diarreia no mundo. Estima-se que ele cause cerca de 685 milhões de casos e 200.000 mortes anualmente (LOPMAN, 2015; XIAO *et al.*, 2017). O vírus pode infectar pessoas de todas as idades, mas a incidência de gastroenterites é maior em crianças pequenas (LOPMAN, 2015). A variedade de genótipos, mutações e recombinações garantem a permanência e difusão desse vírus na população humana (VOLPINI *et al.*, 2019). O genótipo GII.4 é o mais detectado em todo mundo (O'RYAN *et al.*, 2017). Apesar do GII.4 continuar sendo o genótipo mais frequente, outros genótipos – com destaque para o GII.17 – vêm sendo detectados em alguns casos ao redor do globo, sugerindo uma possível substituição da cepa circulante. Além disso, o próprio genótipo GII.4 vem sofrendo diversas recombinações que o mantêm circulante durante todos esses anos. Assim, os órgãos de políticas públicas de saúde precisam estar preparados em caso de aumento de atividade de novos genótipos (CHAN *et al.*, 2017; DE GRAAF *et al.*, 2015; VOLPINI *et al.*, 2019).

Na América Latina, os NoVs também são a principal causa de epidemias de gastroenterites agudas (15% dos casos) e são responsáveis por um a cada seis internamentos por diarreias agudas em crianças com menos de 5 anos. Os dados acerca da epidemiologia no Brasil são escassos. Um dos estudos no país mostrou prevalência de apenas 4% desse vírus em casos de surtos de diarreia aguda, divergindo bastante do Chile, por exemplo, com 45% (O'RYAN *et al.*, 2017). No Brasil, não há um sistema de vigilância epidemiológica dos casos de norovirose. Assim, os dados epidemiológicos no país são bem variáveis conforme diversos fatores, como a população estudada, área de estudo, temperatura do ambiente, etc.

Outro estudo avaliou a prevalência de NoV em surtos no Estado do Rio Grande do Sul e observou que esse vírus foi responsável por quase 50% dos surtos avaliados em um período de 8 anos. Nesse mesmo estudo, o genótipo GII.4 foi mais uma vez o mais encontrado (70% dos casos), entretanto detectou-se pela primeira vez os genótipos GI.1, GII.13 e GII.15 no Brasil (DE ANDRADE *et al.*, 2014). Reforça-se a necessidade de estudos epidemiológicos não só da prevalência como também da distribuição molecular das cepas de NoV no país, afim de promover melhor entendimento sobre esse vírus e o desenvolvimento de estratégias de controle de surtos e diminuição das hospitalizações sobretudo em grupos de risco. Ribeiro *et al.* (2008) determinaram a prevalência de NoV e rotavírus em 68 crianças hospitalizadas no Estado do Espírito Santo. Eles detectaram o NoV em cerca de 40% das amostras do estudo e apenas 20% dessas amostras foram positivas para rotavírus, destacando a crescente importância desse vírus.

Outro estudo, no Estado do Rio de Janeiro, testou 50 amostras de fezes para rotavírus, norovírus, adenovírus e astrovírus e detectou o NoV em 66% delas (FERREIRA *et al.*, 2008).

O Brasil foi o primeiro país a incluir a vacina contra rotavírus no calendário de imunização das quase 4 milhões de crianças nascidas anualmente, e isso tem trazido cada vez mais destaque para o NoV (NAKAGOMI *et al.*, 2008). O número de casos esporádicos e surtos de NoV chamam atenção para a necessidade da implementação do diagnóstico nas unidades de saúde brasileiras (FERREIRA *et al.*, 2010).

Nos Estados de PE e PB poucos estudos foram feitos sobre as noroviroses, biologia do vírus, sua distribuição e prevalência. Nakagomi *et al.* (2008) avaliaram, durante o período de 1 ano, a prevalência de NoV em crianças com menos de 5 anos de idade provenientes de um hospital em Recife-PE. Esses pacientes apresentavam diarreia e tiveram suas amostras testadas por ELISA, onde foi possível detectar o vírus em 15% dos indivíduos. Em PE, o NoV tem muita importância no Estado, visto que, somente no primeiro semestre de 2017, ele foi isolado em 13,63% das amostras de fezes de pacientes com diarreias agudas, sendo o principal vírus causador de diarreia nesses pacientes (LEITE, 2017). Não foram encontradas estatísticas nem estudos epidemiológicos sobre a distribuição de NoV na PB. Até o nosso conhecimento, não há nenhum outro projeto que envolva o estudo do NoV em moluscos e sua distribuição molecular nem PE e nem na PB.

2.4 TRANSMISSÃO E PREVENÇÃO

Devido aos níveis virais elevados e prolongados nas fezes, à disseminação de partículas virais durante infecções assintomáticas e à elevada persistência no ambiente, o NoV é um vírus de fácil transmissibilidade. O vírus pode ser transmitido por múltiplas rotas, porém a via pessoa-pessoa (via fezes e vômito) predomina. Apesar da transmissão zoonótica ainda ser pouco conhecida, sabe-se que os NoVs podem infectar diversas espécies tanto de animais domésticos quanto selvagens e que os HuNoVs poderiam até representar uma zoonose reversa, ao detectar material genético viral dos referidos patógenos humanos em amostras de animais de estimação, suínos, roedores, aves e etc. Entretanto, a transmissão interespecies permanece incerta (LOPMAN, 2015; MATHIJS *et al.*, 2012; SOKEL; KALE, 2019; VILLABRUNA *et al.*, 2019).

Apesar da via fecal-oral ser a mais comum, em muitos surtos a transmissão se dá por água ou alimento contaminados. A transmissão por alimento representa cerca de 15% dos casos de noroviroses (LOPMAN, 2015; MATHIJS *et al.*, 2012). Alguns chamam o NoV de perfeito patógeno para transmissão alimentícia. Uma grande parte das doenças transmitidas por

alimentos não são de notificação compulsória no Brasil, mesmo sendo um importante problema de saúde pública. Por isso, pouco se sabe sobre a distribuição de NoV em alimentos, sendo esses dados provenientes, prevalentemente, de pesquisas desenvolvidas no país (MERUSSI *et al.*, 2012).

Apesar de não conseguir se multiplicar em alimentos e no ambiente, o vírus tem a capacidade de persistir por muito tempo (MOORE *et al.*, 2015). Dentre os alimentos que participam da transmissão de NoV, pode-se destacar os moluscos bivalves, que têm a capacidade de bioacumulação de microrganismos, incluindo os vírus, presentes no ambiente marinho em que vivem (HASSARD *et al.*, 2017).

Ações para evitar a transmissão são a melhor forma de prevenção (CARDEMIL *et al.*, 2017). A implantação de medidas básicas de controle de infecção usualmente é suficiente para diminuir o ciclo de transmissão: isolamento dos doentes, melhora da higienização das mãos e do ambiente, etc. Entretanto, estratégias de controle variadas, abrangendo todas as formas de transmissão, são extremamente importantes para uma maior regulação da disseminação viral (GAYTHORPE *et al.*, 2017; MARSH *et al.*, 2017). Devido às norovirose serem doenças normalmente auto limitantes, ações diagnósticas e preventivas às vezes não são priorizadas pelos governantes, favorecendo a alta disseminação do vírus (INNS *et al.*, 2017).

2.4.1 Transmissão via moluscos bivalves

Doenças transmitidas por frutos do mar contaminados, mais precisamente por moluscos bivalves, são um grande problema de saúde pública em todo o mundo. O NoV é considerado um patógeno de grande preocupação dentre os transmitidos por esse tipo de alimentação, sendo o principal agente encontrado em diversos surtos envolvendo ostras (ALFANO-SOBSEY *et al.*, 2012; ELBASHIR *et al.*, 2018). Esse vírus representa um risco não só para a saúde humana, mas também para a indústria alimentícia mundial. A contaminação de moluscos por NoV está relacionada a diversos fatores ambientais que vão além do despejo de esgoto: baixa radiação solar, baixa temperatura da água, maré baixa, baixa salinidade, chuvas e ventos fortes (CHENAR; DENG, 2018).

O NoV consegue se manter no ambiente marinho por vários dias. A existência de conhecimentos limitados acerca da inativação do vírus em moluscos e no ambiente dificulta ainda mais a avaliação de risco de infecção e o estabelecimento de condições ideais de consumo. Apesar do NoV na maioria das vezes ser inativado pelo calor, as ostras (que normalmente são consumidas cruas) representam o maior percentual de moluscos bivalves envolvidos em surtos

de gastroenterites causadas por esse vírus. Além disso, alguns têm relatado que a depuração das ostras não é suficiente para a completa eliminação do vírus (HASSARD *et al.*, 2017; LE MENNEC *et al.*, 2017). A depuração é um processo que ocorre em tanques com capacidade de recirculação de água que visa eliminar patógenos dos tecidos de moluscos, ao fornecer água livre de contaminantes para que esses animais a filtrem. O NoV tem demonstrado capacidade de persistir em moluscos mesmo após depuração (GARCIA *et al.*, 2015; RAZAFIMAHEFA *et al.*, 2019).

No litoral de PE encontram-se vários estuários naturais com grandes quantidades de moluscos bivalves, sendo a ostreicultura uma atividade que é renda e emprego para diversas pessoas (LAVANDER *et al.*, 2007). No Estado da PB, os moluscos representam um dos recursos mais explorados pelas comunidades humanas que vivem em áreas próximas aos manguezais. Essas comunidades são, normalmente, extremamente pobres e vivem em áreas onde o saneamento básico é inexistente e os dejetos produzidos por essas comunidades ribeirinhas são despejados diretamente no ambiente aquático. Isso compromete o sistema estuário-manguezal e coloca em risco o meio ambiente e a qualidade microbiológica dos moluscos coletados na área (NISHIDA *et al.*, 2008).

Assim, a detecção viral nesses animais é importante como parâmetro adicional na avaliação da qualidade da água, que usualmente é feita baseada apenas na detecção de coliformes fecais, os quais indicam contaminação apenas por bactérias. Isso pode mascarar a real situação ambiental da água e alimentos consumidos pela população (VIEIRA *et al.*, 2012).

2.5 DOENÇA

O período de incubação do vírus dura de 24 a 48h. Após esse período, a doença se instala e os sintomas mais comumente apresentados são vômito, diarreia não sanguinolenta, náuseas, cólicas abdominais e febre baixa. Algumas pessoas apresentam apenas vômito ou diarreia. Em indivíduos saudáveis os sintomas geralmente duram dois dias e a doença é auto limitante na maioria dos pacientes. A maior parte dos surtos ocorre em comunidades semifechadas como asilos, escolas, hospitais e cruzeiros (VINJE, 2015). Estima-se que um indivíduo saudável residente nos Estados Unidos da América (EUA) desenvolva infecções por NoV cinco vezes em sua vida (BARTNICKI *et al.*, 2017). Observa-se, assim, que apesar de ser auto limitante, trata-se de uma virose de extrema importância e com capacidade de causar impactos na vida dos pacientes, além do impacto econômico no país. Em crianças, o NoV tem ganhado destaque com sintomas e gravidade semelhantes ao do rotavírus (RIERA-MONTES *et al.*, 2017). A

diarreia em crianças, sobretudo menores de cinco anos, é um grande problema de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Nesse grupo, observa-se episódios graves de vômito, às vezes ainda mais frequente que a diarreia. Além das crianças, em idosos também há uma maior incidência de doença grave (LOPMAN, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2008). Em pacientes imunocomprometidos também se observa uma doença que pode ser mais severa e longa, com excreção viral persistente em alguns indivíduos (ROBILOTTI *et al.*, 2015). Em adultos saudáveis complicações são mais raras, entretanto já foram relatados sintomas neurológicos, colite isquêmica, constipação, etc. Essas complicações podem levar à sintomatologia prolongada e até morte (CARDEMIL *et al.*, 2017).

O manejo terapêutico usualmente é de suporte e alívio dos sintomas (ROBILOTTI *et al.*, 2015). Apesar dos esforços e progressos da ciência, ainda não há terapia antiviral específica disponível para gastroenterites causadas por NoV. Também não há vacina disponível no mercado, entretanto existem algumas vacinas candidatas em fases diferentes de desenvolvimento e novas descobertas são feitas a cada dia (AZIM *et al.*, 2019; CARDEMIL *et al.*, 2017; CORTES-PENFIELD *et al.*, 2017; LINDESMITH *et al.*, 2019). Pela ausência de tratamento, altos custos e indisponibilidade de kits diagnósticos, alguns países menos desenvolvidos não realizam o diagnóstico de NoV. Essa situação precisa mudar, visto que o vírus é altamente contagioso e tão grave quanto rotavírus (KU *et al.*, 2014).

2.6 DETECÇÃO VIRAL E DIAGNÓSTICO

Devido ao número crescente de casos e ao NoV estar se tornando um problema cada vez mais sério de saúde pública, um diagnóstico laboratorial rápido é essencial para permitir a correta implementação de medidas de controle específicas afim de reduzir a disseminação do vírus e gravidade dos surtos (VINJE, 2015). O NoV era um vírus muito difícil de ser detectado no passado, mas com os avanços tecnológicos, sobretudo no campo da biologia molecular, e a recente descoberta de métodos preliminares de isolamento viral, portas têm se aberto para o descobrimento de vários aspectos desse patógeno, permitindo a prevenção da infecção, tratamento e controle da doença (BARTNICKI *et al.*, 2017; ETTAYEBI *et al.*, 2016; JONES *et al.*, 2014).

2.6.1 Isolamento viral

Um sistema de cultivo *in vitro* é essencial para o estudo da interação entre o NoV e o hospedeiro, permitindo determinar como prevenir a transmissão, melhorar a segurança alimentícia, desenvolver novas metodologias diagnósticas, vacinas e tratar a doença. Permite também avanços nas pesquisas envolvendo a evolução, imunidade e patogênese NoVs. Tentou-se, por mais de 40 anos, cultivar, sem sucesso, o HuNoV. Até que Guix *et al.* (2007) conseguiram promover um único ciclo replicativo com montagem e liberação da partícula viral em células de mamíferos.

Jones *et al.* (2014) descreveram pela primeira vez o cultivo celular propriamente dito de HuNov. Trata-se de um sistema envolvendo células B, que requer bactérias entéricas expressando HBGAs. Por não ser um sistema tão aplicável e de fácil implementação, estudos continuam sendo feitos para aprimorar o isolamento viral. Recentemente, Ettayebi *et al.* (2016) descreveram o cultivo de cepas de HuNoV em enterócitos derivados de células-tronco, com a bile sendo essencial para a replicação viral. Entretanto, a ausência da expressão dos Ags do grupo sanguíneo em células intestinais diminui e dificulta a replicação do vírus. Além disso, estudos futuros ainda devem ser realizados para determinar quais componentes da bile exatamente promovem a replicação. Qu *et al.* (2016) descreveram um sistema de isolamento viral onde foi observada a expressão de proteínas tanto estruturais quanto não estruturais, levando à conclusão de que era possível não só a replicação de HuNoVs como também a montagem e liberação da partícula viral. Entretanto, os autores destacaram que os sistemas apresentados no estudo não eram totalmente capazes de representar o ciclo replicativo completo do NoV.

Novos sistemas vêm sendo descritos a cada dia, como podemos observar em Dycke *et al.* (2019) e em Sato *et al.* (2019): o primeiro estabeleceu um método de cultivo de HuNoV em larvas de peixe zebra e o segundo em células-tronco pluripotentes derivadas de células epiteliais intestinais. Isso aumenta a esperança de estabelecimento de uma metodologia reprodutível e aplicável para isolamento do NoV. Mas, apesar de esses estudos serem promissores, percebe-se que o isolamento do HuNoV ainda não é 100% possível e que muito ainda deve ser aprimorado para que essa metodologia esteja disponível para diagnóstico nos laboratórios do mundo. Inúmeros desafios ainda permanecem não solucionados para o um sistema de cultivo para esse vírus (Estes *et al.*, 2019).

2.6.2 Métodos imunológicos

O ELISA foi desenvolvido nos anos 70 com o objetivo de simplificar a técnica imunológica existente na época, que utilizava radiação para marcar Ags. A marcação de Ag com enzimas não só é mais fácil, como também mais segura e estável (ENGVALL; PERLMANN, 1971). Essa técnica consiste basicamente na fixação de um Ac ou Ag em uma fase sólida (normalmente uma placa de 96 poços). Após a adição da amostra, que poderá se ligar a esse Ag ou Ac, um reagente ligado a uma enzima se liga a esse complexo Ag-Ac que é revelado com a adição do substrato da enzima mais um cromógeno. A reação será observada colorimetricamente, e seus resultados são analisados através de absorbâncias medidas com espectrofotômetros (CAVALVANTI *et al.*, 2008).

A diversidade genética do NoV é um grande desafio para o desenvolvimento de um ELISA mais sensível e específico, entretanto existem vários kits para detecção do vírus em amostras de fezes disponíveis no mercado que facilitam estudos epidemiológicos de larga escala. Por sua baixa sensibilidade, que está relacionada ao genótipo circulante em determinada população, amostras de surtos negativas no ELISA devem ser confirmadas por RT-PCR (LOPMAN, 2015; NAKAGOMI *et al.*, 2008; PATEL *et al.*, 2009).

2.6.3 Métodos moleculares

O desenvolvimento de métodos moleculares permitiu grande evolução no estudo dos NoVs, como descrito a seguir.

2.6.3.1 PCR e PCR em tempo real

A PCR foi desenvolvida por Kary Mullis e colaboradores nos anos 80 e desde então vem sendo amplamente utilizada para diversos propósitos como, por exemplo, clonagem, engenharia genética, sequenciamento, detecção de diversos patógenos e etc. A PCR é um sistema de amplificação exponencial do ácido desoxirribonucleico (DNA) que utiliza dois iniciadores (*primers*) específicos que se anexam ao DNA alvo, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), uma polimerase resistente ao calor e íons de magnésio em um tampão. Ela simula *in vitro* a habilidade natural da replicação do DNA. A reação ocorre em ciclos de diferentes temperaturas. Inicialmente a mistura é incubada em alta temperatura (em torno de 95°C), a fim de separar e desenrolar a dupla fita do DNA. Em seguida, diminui-se a temperatura para que os *primers* se anelem na fita molde de DNA e finalmente ajusta-se a temperatura para

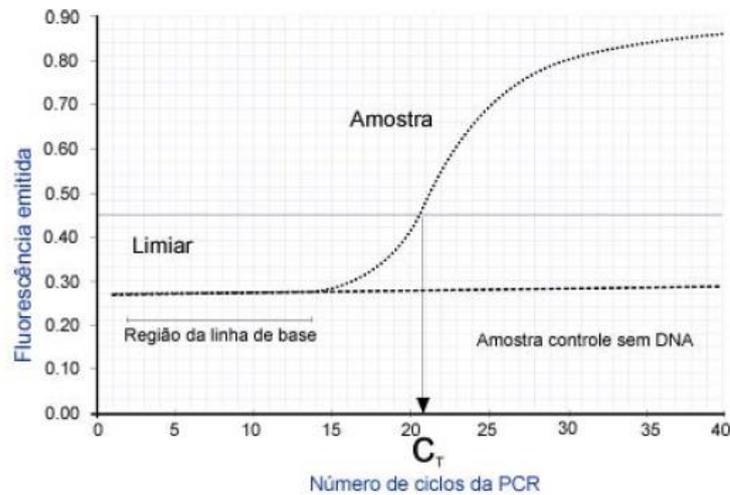
72°C para promover a extensão do novo DNA pela polimerase com a incorporação dos dNTPs (CAVALVANTI *et al.*, 2008; Kubista *et al.*, 2006).

No caso de patógenos cujo material genético é o RNA, como o NoV, a PCR deve antes ser precedida de uma reação de RT, a fim de que esse RNA seja transcrito reversamente em um DNA complementar (cDNA), que será usado como molde na PCR. Com o desenvolvimento de testes moleculares para fins diagnósticos, infecções virais, sobretudo as causadas pelo NoV, têm ganhado reconhecimento (HAMER, 2018).

O diagnóstico e a identificação rápidos da causa de um surto é a chave para controle da infecção viral, sendo as técnicas moleculares perfeitamente indicadas para esse fim. Diversos protocolos de RT-PCR convencional e em tempo real foram desenvolvidos para detecção do NoV. Mas sabe-se que a RT-qPCR é a técnica mais sensível e específica para o seu diagnóstico (LOPMAN, 2015; ROBILOTTI *et al.*, 2015).

A RT-qPCR é uma adaptação da PCR convencional, onde o material amplificado é detectado em tempo real através da emissão de fluorescência dos corantes ou sondas fluorescentes utilizados na reação. Essa fluorescência pode ser detectada por filtros do termociclador específico e expressa na forma de gráfico através da utilização de *softwares*. À medida que a amplificação ocorre e a fluorescência aumenta, o gráfico vai sendo construído correlacionado com os ciclos da reação. No final, uma linha é traçada paralelamente ao eixo dos ciclos cruzando o gráfico na altura que se inicia a amplificação exponencial do produto. Essa linha serve para determinar o limite de detecção, separando a real amplificação dos produtos inespecíficos que usualmente aparecem no início da reação. Ela se chama *threshold* e o ciclo da reação em que ela cruza a linha de amplificação do produto é chamado *Cycle threshold* (Ct) e permite determinar a quantidade de ciclos necessárias para o início da amplificação do alvo (CAVALVANTI *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2010).

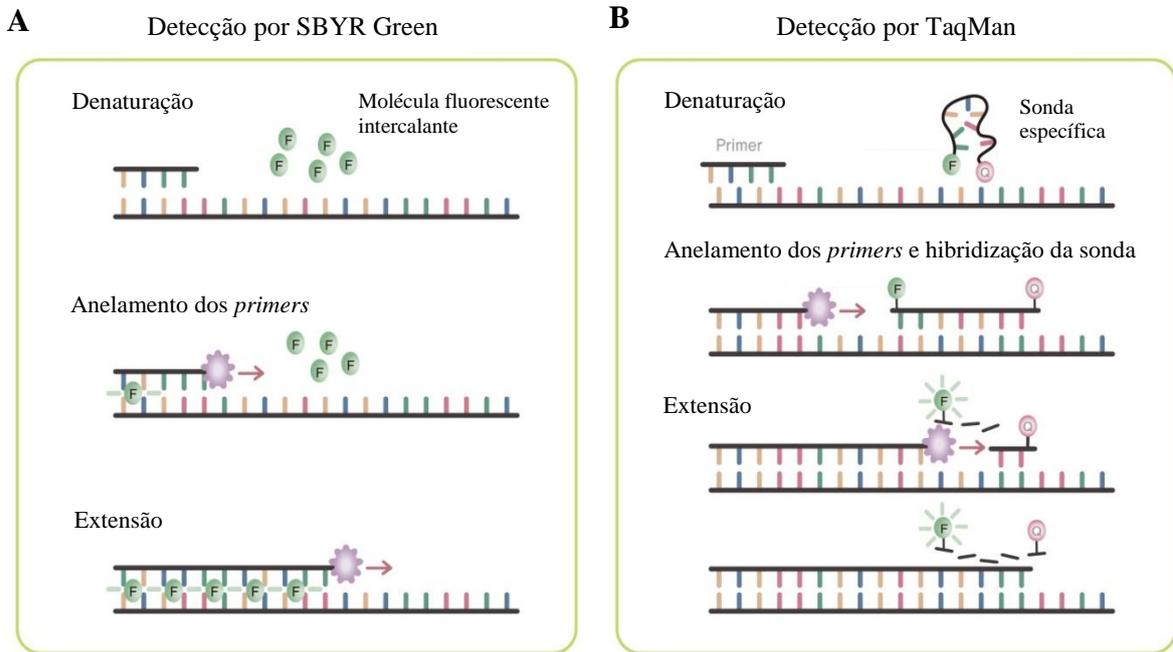
Um típico gráfico gerado durante a PCR em tempo real está ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – Gráfico gerado durante a amplificação na PCR em tempo real.

Fonte: Novais *et al.* (2004).

Legenda: Figura ilustrando o gráfico gerado durante a PCR em tempo real. A linha de base separa o produto amplificado de produtos inespecíficos e produtos não amplificados como amostras negativas e controles negativos. Ao cruzar a linha limiar de amplificação, temos uma amostra positiva, onde se observa a fase log, que o produto dobra a cada ciclo, seguida da fase platô, onde não há mais amplificação e aumento do produto de PCR. Destaque para o C_t que é o ciclo da PCR que a amostra cruza a linha limiar ou *threshold*.

As tecnologias mais utilizadas na RT-qPCR são o sistema TaqMan® e SYBR® Green. O sistema TaqMan® usa sondas desenhadas especificamente para se anelarem ao alvo molecular que se deseja amplificar. Essas sondas são marcadas com uma molécula emissora de fluorescência (*repórter* ou fluoróforo) e uma que absorve fluorescência (*quencher*), que ficam em equilíbrio até a sonda ser clivada pela polimerase durante a amplificação do DNA. Nesse momento, a fluorescência é emitida e capturada pelo equipamento. Já a SYBR® Green é uma molécula que se liga a qualquer fita dupla de DNA e, após ligação, emite fluorescência verde quando excitada pela luz do sistema ótico do termociclador. Sendo assim, à medida que há amplificação do produto, ela se intercala à dupla fita do DNA recém sintetizado e emite fluorescência, que é detectada pelo aparelho. Esse último sistema, além de ser mais barato e fácil de usar, aumenta as chances de detecção de microrganismos com grande diversidade genética, como é o caso do NoV, por não ser tão específico (NOVAIS *et al.*, 2004). A RT-qPCR utilizando a tecnologia SYBR® Green é, portanto, uma tecnologia rápida, reprodutível e sensível para a detecção do NoV. Uma comparação gráfica dessas duas tecnologias está ilustrada na Figura 8.

Figura 8 – Principais metodologias utilizadas na PCR em tempo real.

Fonte: GenomicTree (2019).

Legenda: Esquema demonstrando as principais metodologias utilizadas para amplificação e detecção do produto na PCR em tempo real. (A) Pelo sistema SYBR Green. A molécula de SYBR Green (F) se intercala da dupla fita de DNA recém sintetizada emitindo fluorescência. (B) Sistema TaqMan. A sonda TaqMan é desenhada para se anelar especificamente ao alvo, e se liga mantendo equilíbrio das suas moléculas emissora (F) e receptora (Q) de fluorescência. À medida que ocorre amplificação do DNA, ela é lisada e emite a fluorescência que será detectada pelo termociclador.

2.6.3.2 Sequenciamento e Sequenciamento de Nova Geração

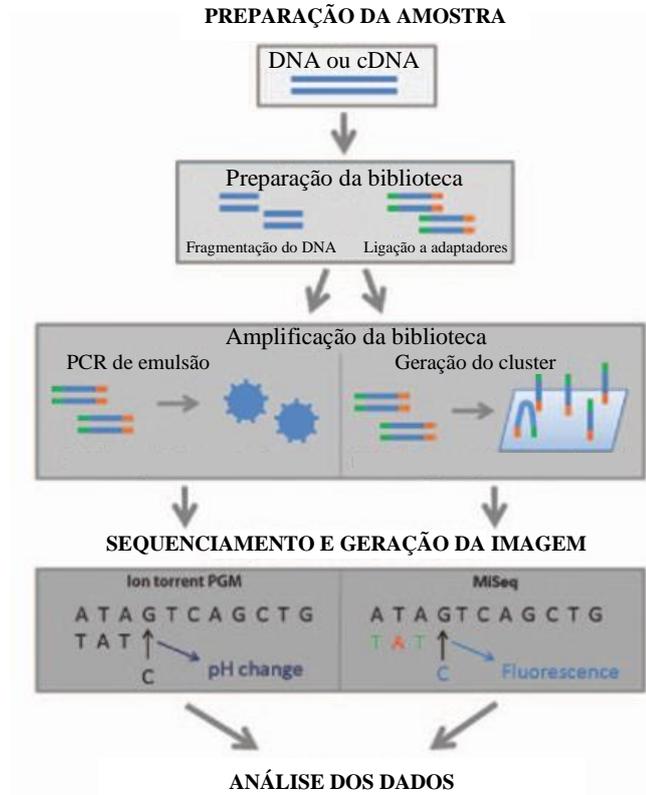
O NoV tem mostrado sua importância no mundo todo, sobretudo no que se refere à sua resistência e capacidade de permanecer no ambiente. Acompanhar a epidemiologia desse vírus é muito importante para um melhor monitoramento genético dos genótipos circulantes, estudos relacionados à patogênese viral, evolução epidemiológica de novas cepas circulantes, desenvolvimento de vacinas, etc (DE GRAAF *et al.*, 2015).

O sequenciamento genômico é uma metodologia utilizada para determinar a sequência correta de nucleotídeos em uma molécula de DNA ou RNA, permitindo o conhecimento das informações genéticas contidas nas amostras sequenciadas (FIETTO; MACIEL, 2015). O primeiro sequenciamento de um genoma completo foi publicado há mais de 40 anos por Frederick Sanger (GARRIDO-CARDENAS *et al.*, 2017; SANGER *et al.*, 1977). Além de Sanger, Maxam e Walter Gilbert também desenvolveram, em 1977, uma técnica de sequenciamento baseada em hidrólise química (MAXAM; GILBERT, 1977).

O sequenciamento de DNA se baseia na utilização de didesoxiribonucleotídeos (ddNTPs), que são nucleotídeos modificados que não possuem o grupo OH livre do carbono 3' da pentose e funcionam como terminadores da síntese de DNA. Cada ddNTP é marcado com um fluoróforo de cor diferente, que terá fluorescência detectada pelo sequenciador. A ausência de grupamento OH faz com que a polimerase pare a adição de novos nucleotídeos no DNA ao encontrar um ddNTP, pois os dNTPs são incapazes de se ligar na ausência da hidroxila livre na posição 3' (FIETTO; MACIEL, 2015; GARRIDO-CARDENAS *et al.*, 2017).

Desde o estabelecimento do sequenciamento, a técnica, inicialmente manual e com capacidade de sequenciar poucos kilobases (Kb), evoluiu para um sequenciamento bem mais robusto, seguro, de genomas completos em paralelo e em intervalos de tempo menores (FIETTO; MACIEL, 2015). Novas tecnologias, como o sequenciamento de nova geração (NGS), podem ser muito úteis nas descobertas sobre o NoV, no estabelecimento de novas espécies infectadas pelo vírus, por exemplo (GREEN, 2013). Desde a primeira metodologia de NGS proposta pela Roche, o sequenciador 454, em 2005, várias novas tecnologias foram desenvolvidas. Podemos citar, como exemplos, o método Polony (método de amplificação por emulsão) utilizando o sequenciador SOLID da Applied Biosystems e o método de amplificação em ponte utilizando o Genome Analyses da Illumina (FIETTO; MACIEL, 2015).

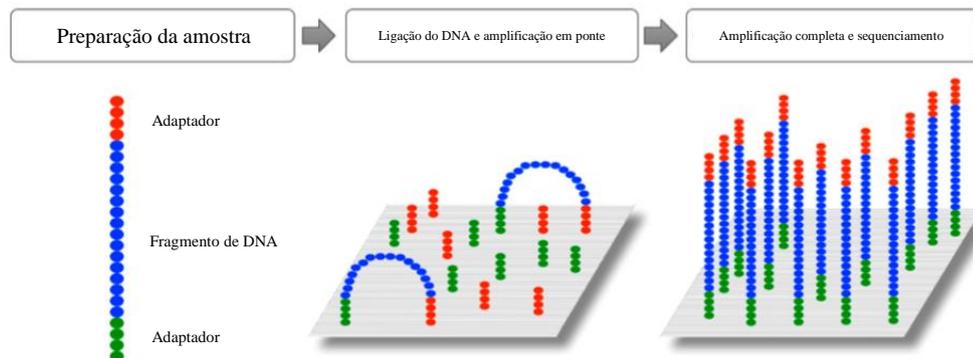
O NGS, comparado ao método tradicional de Sanger, tem capacidade muito maior de sequenciamento com custo reduzido. O funcionamento do NGS se divide basicamente em três etapas, ilustradas na Figura 9: (1) preparo da biblioteca, (2) sequenciamento e (3) geração de imagem e análise dos dados obtidos. A primeira etapa consiste na fragmentação do ácido nucleico previamente amplificado e ligação desses fragmentos a adaptadores formando a biblioteca para sequenciamento que, em seguida, é amplificada. Na segunda etapa, a biblioteca amplificada serve como molde para síntese de novos fragmentos de DNA e à medida que os nucleotídeos incorporam no novo DNA sintetizado, eles são gravados na plataforma de sequenciamento como a sequência do alvo. Uma vez que a reação acaba, os dados gravados precisam passar por uma série de análises, culminando a terceira etapa. Nela, os dados passam por uma triagem eliminando as sequências dos adaptadores e leituras de baixa qualidade. Uma vez que os dados de melhor qualidade estão selecionados, eles podem ser alinhados com sequências modelo disponíveis *online* e diversas análises podem ser realizadas com ferramentas de bioinformática disponíveis (GRADA; WEINBRECHT, 2013).

Figura 9 – Etapas do sequenciamento de nova geração.

Fonte: Adaptado de Grada e Weinbrecht (2013).

Legenda: Fases do sequenciamento de nova geração demonstrando as plataformas Ion torrent (esquerda) e MiSeq (direita): preparo da amostra e da biblioteca, com a fragmentação do DNA e ligação a adaptadores; amplificação da biblioteca; sequenciamento e análise dos dados obtidos.

O NGS é uma técnica confiável e efetiva para monitoramento das doenças entéricas, incluindo as norovirose. Esse monitoramento é importante para o conhecimento e evolução do manejo da doença, e também para novas descobertas como o desenvolvimento de vacinas. Entretanto, essa técnica deve ser cada vez mais aprimorada – reduzindo-se os custos, por exemplo – para que ela possa ser mais facilmente aplicada (FISCHER *et al.*, 2019). Enquanto o NGS ainda apresenta algumas dificuldades, o sequenciamento de Sanger continua sendo muitas vezes utilizado para monitoramento da distribuição molecular de NoV. Mais detalhes do NGS MiSeq na plataforma Illumina estão ilustrados na Figura 10.

Figura 10 – Sequenciamento de nova geração do Illumina.

Fonte: Adaptado de Garrido-Cardenas *et al.* (2017).

Legenda: Os fragmentos do DNA alvo indexados com adaptadores são ligados aos *primers* immobilizados em uma superfície sólida, ocorrendo uma amplificação em forma de ponte e gerando aglomerados de DNA com moléculas idênticas. A cada ciclo de amplificação, os quatro nucleotídeos são acrescentados e a emissão de fluorescência gerada por esses nucleotídeos vai sendo detectada

3 JUSTIFICATIVA

Os NoV são os principais agentes virais responsáveis por surtos de gastroenterite aguda acometendo indivíduos de todas as faixas etárias em todo o mundo e são altamente contagiosos disseminando-se facilmente de pessoa para pessoa pela via fecal-oral, seja diretamente através das mãos, superfícies ou aerossóis, ou indiretamente através de alimentos. Em um estudo clínico realizado em Recife/PE, Nakagomi *et al.* (2008) salientaram a importância do NoV como causa de diarreia grave em crianças, porém a fonte de infecção e as características moleculares desses vírus não foram determinadas. Dentre os alimentos que estão frequentemente associados aos surtos de norovirose, destacam-se os moluscos bivalves por apresentarem hábito alimentar filtrador e capacidade de bioacumulação. Apesar de alguns estudos isolados terem caracterizado o impacto da infecção por NoV em populações humanas em diferentes regiões do Brasil (CAMPOS *et al.*, 2008; Fioretti *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2008), poucos trabalhos investigaram a presença de NoV em moluscos bivalves. Nenhuma investigação dessa natureza foi realizada em moluscos coletados no Estado de Pernambuco nem da Paraíba. A avaliação da qualidade da água, não só no Nordeste como em todo Brasil, usualmente utiliza a detecção de coliformes fecais, os quais são indicadores de contaminação por bactérias como *Escherichia coli*, mas não por vírus. A detecção de vírus em moluscos bivalves pode ser um parâmetro adicional importante na análise da contaminação ambiental e qualidade da água (VIEIRA *et al.*, 2012).

Além disso, o monitoramento e caracterização molecular das cepas causadoras de norovirose circulantes no país é essencial para melhores políticas de prevenção, controle e maior atenção aos pacientes acometidos pelo NoV. Até nosso conhecimento, não há nenhum estudo que sequenciou e caracterizou os genótipos de NoV no estado de PE nem da PB, demonstrando a necessidade desse tipo de estudo nas referidas localidades. Assim, o sequenciamento dessas cepas, tanto pela metodologia de Sanger quanto NGS, é inédito nesses estados e de grande utilidade. O uso do NGS para caracterizar NoV representa o “Estado da Arte” na área. Espera-se que os resultados obtidos possam auxiliar os gestores públicos no desenvolvimento de estratégias de controle para reduzir o risco para a saúde pública de humanos e para garantir a sustentabilidade da catação de moluscos na região. Por último, os resultados desse trabalho serão fundamentais para o estabelecimento de um banco genômico de RNA contendo sequências detalhadas sobre os NoV, contribuindo assim para a descoberta de fatores de virulência, desenvolvimento de vacinas e estratégias de controle inovadoras, tal como RNA de interferência (RNAi).

4 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil epidemiológico e molecular da contaminação por norovírus nas principais espécies de moluscos bivalves exploradas e em humanos no Nordeste brasileiro

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver e validar um ensaio de RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) para a detecção e quantificação de NoV em amostras teciduais de moluscos bivalves e amostras de fezes de humanos;
- b) Detectar e quantificar a presença de NoV por RT-qPCR em ostra (*Crassostrea rhizophorae*), sururu (*Mytella guyanensis*) e marisco (*Anomalocardia brasiliiana*) obtidas diretamente dos catadores de moluscos, comercializados por vendedores ambulantes ou em Mercados Públicos no litorais pernambucano e paraibano;
- c) Detectar a presença de NoV por RT-qPCR em amostras de fezes de humanos coletadas no Estado de PE;
- d) Sequenciar os NoVs encontrados em bivalves e em fezes de humanos e caracterizá-los filogeneticamente;
- e) Criar um banco genômico contendo RNA noroviral extraído a partir de moluscos e fezes e suas respectivas sequências e disponibilizá-los à comunidade científica para melhorar nossa compreensão sobre os diversos aspectos da biologia dos NoV.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

A seguir, são descritos os procedimentos metodológicos para execução desse trabalho.

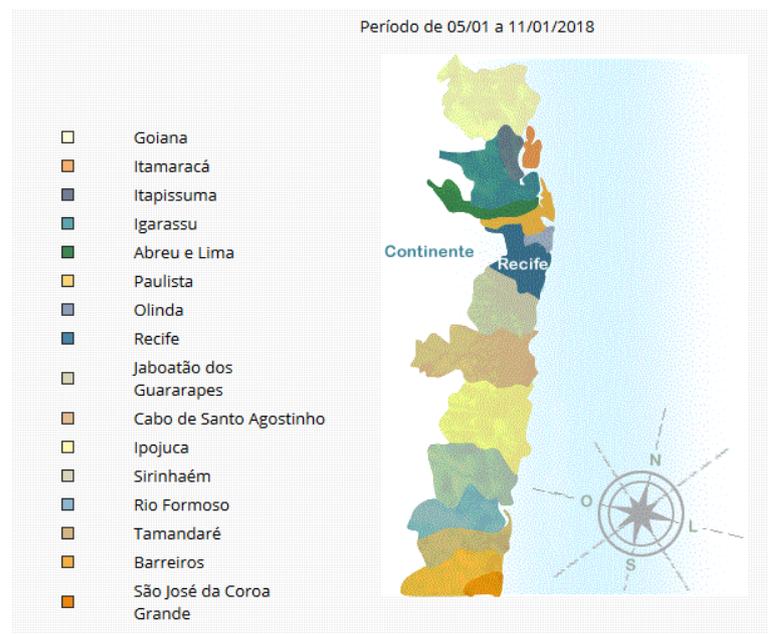
5.1 OBTENÇÃO DOS MOLUSCOS BIVALVES

Inicialmente serão expostos os procedimentos para obtenção das amostras de moluscos bivalves em PE e na PB.

5.1.1 Área de estudo – Pernambuco

A área de estudo se baseou nos critérios de amostragem estabelecidos pelo Programa de monitoramento da qualidade das praias de Pernambuco realizado pela Agência Estadual de Meio Ambiente (CPRH) que conta com 47 pontos de amostragem distribuídos em 16 municípios litorâneos.

Figura 11 – Mapa do litoral Pernambucano.



Fonte: Agência Estadual de Meio Ambiente – CPRH (2018).

5.1.2 Área de estudo – Paraíba

O estudo foi realizado nos dois maiores estuários do Estado da Paraíba: o Estuário do rio Mamanguape e Estuário do rio Paraíba do Norte. O primeiro estuário está situado na parte setentrional do litoral da Paraíba, a 80 quilômetros (km) da cidade de João Pessoa, e possui aproximadamente 24 km de extensão e uma largura máxima em torno de 2,5 km, nas proximidades de sua desembocadura e engloba os municípios de Rio Tinto, Marcação, Lucena e Baía da Traição. O segundo, o estuário do rio Paraíba do Norte, drena as cidades de João Pessoa, Bayeux e Santa Rita, e próximo à desembocadura, a cidade portuária de Cabedelo.

5.1.3 Coleta dos moluscos e espécies estudadas

Nas áreas de estudo mencionadas, foram obtidas as principais espécies de moluscos bivalves explorados em PE e na PB: ostra (*Crassostrea rhizophorae*), sururu (*Mytella guyanensis*), e marisco (*Anomalocardia brasiliiana*), ilustrados, respectivamente, nas Figura 12, 13 e 14. As coletas em PE foram feitas de maneira padronizada, onde para cada área foram coletadas 10 ostras e/ou 20 sururus. Não foram coletados mariscos em PE pela ausência desses animais nas áreas visitadas. Na PB, devido à dificuldade de obtenção das amostras, as coletas foram realizadas de acordo com a disponibilidade de moluscos em cada região visitada. Após processamento e dissecação dos moluscos coletados conforme item 5.2, os seus tecidos foram unidos, se necessário, de maneira que formassem porções com 1-2 gramas (g).

Os moluscos foram obtidos *in natura*, ou seja, dentro da casca. Alguns moluscos precisaram ser obtidos na forma de filé - quando já eram pré-processados - forma coletada exclusivamente na PB, devido às coletas realizadas em Mercados Públicos.

Os moluscos foram coletados durante os meses de inverno (junho-setembro), verão (dezembro-março) e outono (março-junho), diretamente dos catadores que atuam em sítios de coleta artesanal, de vendedores ambulantes que atuam nas praias e também nos mercados públicos da cidade de João Pessoa. As amostras de moluscos foram armazenadas em caixa térmica sob refrigeração com gelo logo após sua coleta, e transportadas para as dependências do Departamento de Virologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM)-Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)/PE para processamento. Durante a coleta, questionários indicando algumas informações sobre as amostras e os catadores foram preenchidos pelos desenvolvedores desse estudo (Apêndice A).

Figura 12 – Ostras coletadas no estudo.

Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Exemplo de algumas ostras coletadas e abertas nesse estudo.

Figura 13 – Sururus coletados no estudo.

Legenda: Exemplo de alguns sururus coletados e abertos nesse estudo.

Fonte: elaborada pela autora.

Figura 14 – Mariscos coletados no estudo.

Legenda: Exemplo de alguns mariscos coletados e abertos nesse estudo.

Fonte: elaborada pela autora.

5.2 PROCESSAMENTO DOS MOLUSCOS

Quando obtidos *in natura* (na casca), a parte externa dos moluscos foi lavada abundantemente com água corrente e eles foram abertos com auxílio de uma pequena faca pontiaguda. Quando em forma de filé, os moluscos foram separados individualmente para dissecação em placa de Petri. Em seguida, com auxílio de pinça e bisturis, a porção gastrointestinal correspondente ao estômago e divertículo digestivo (Figura 15) foi removida por dissecação e o restante foi descartado. As amostras teciduais foram pesadas e reunidas, se necessário, de maneira a formar porções de 1 a 2g e foram processadas de acordo com Jothikumar *et al.* (2005). Resumidamente, os tecidos foram pesados e adicionou-se um volume igual de proteinase K 100 microgramas (μg)/mililitros (ml) para lise do tecido. Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora (h) com agitação de 320 rotações por minuto (rpm). Posteriormente, a mistura foi incubada a 65°C por 15 minutos (min) para inativar a proteinase K e centrifugada a 3.000 x g por 5 min. As amostras foram armazenadas a 4°C até a extração do RNA.

Figura 15 – Interior de uma ostra.



Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Parte interna de uma das ostras do estudo, evidenciando (círculo branco) a porção tecidual dissecada para processamento e posterior detecção dos NoVs.

5.3 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

A extração do RNA viral foi realizada com o kit QIAmp® Viral RNA Mini kit (Qiagen, EUA) a partir de 140µl do sobrenadante dos tecidos previamente processados, seguindo recomendações do fabricante. O RNA foi eluído em um volume final de 60µl do *buffer* de eluição (*buffer* AVE) fornecido pelo kit.

5.4 SPIKE DE OSTRAS

Esse experimento serviu para avaliar a sensibilidade clínica da RT-qPCR padronizada nesse estudo (item 5.10) e para descartar a possível presença de contaminantes nas amostras de moluscos. Porções de 1g de ostras foram contaminadas artificialmente com uma curva de diluição de fator 10 de uma amostra sabidamente positiva para NoV. De maneira resumida, uma curva de diluição de 1:10 a 1:10000 foi realizada a partir de uma suspensão fecal positiva para NoV GII (concentração de $2,7 \times 10^4$ cópias/µl) diluída em PBS 1X. Um volume de 100 µl de cada ponto da curva foi adicionado às porções de 1g de divertículo gástrico de ostra dissecado, que foram processadas, em seguida, como descrito acima.

5.5 CONTROLES POSITIVOS

As amostras positivas para os genogrupos GI e GII foram gentilmente cedidas pela pesquisadora Marize Miagostovich, da FIOCRUZ/RJ, e pelo Laboratório Central de Saúde Pública “Dr Milton Bezerra Sobral” (LACEN)/PE, respectivamente.

O controle positivo para genogrupo GI foi enviado para o IAM na forma de suspensão fecal e teve seu material genético extraído diretamente conforme item 5.3. As amostras de fezes cedidas pelo LACEN/PE ($n=6$) foram recebidas *in natura* e precisaram ser previamente diluídas para posterior extração do RNA. Para diluição, as referidas amostras foram tratadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1X, de maneira a se obter uma solução 10%, em seguida vortexadas por 15 segundos (s) e então centrifugadas a 2000 x g por 15min.

O processamento das amostras de fezes seguiu o protocolo descrito por Jothikumar *et al.* (2005).

Assim, posteriormente, o RNA foi extraído do sobrenadante obtido após centrifugação.

5.6 TRANSCRIÇÃO REVERSA

Os RNAs extraídos dos controles positivos foram transcritos reversamente com o sistema ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, EUA), utilizando 1µl de *primer* reverso específico na concentração de 10µM (para GI ou GII) (Quadro 2) para cada 4µl de RNA. Essa mistura foi realizada no gelo e incubada a 70°C por 5min. Em seguida, a mistura foi incubada por mais 5 min no gelo e foi adicionado a cada tubo 15µl da reação contendo 4µl do *buffer*, 5µl de cloreto de magnésio (MgCl₂), 1µl de dNTPs 5µM, 1µl da enzima transcriptase reversa Improm II e 4µ de água livre de nucleases e incubado a 25°C por 5min, 42°C por 1h e 70°C por 15min. O DNA complementar (cDNA) gerado foi utilizado como molde para a PCR convencional.

5.7 PCR CONVENCIONAL

Para confirmar os genogrupos dos controles positivos, foram realizadas PCRs convencionais da amostra da FIOCRUZ/RJ e das amostras do LACEN/PE, utilizando os *primers* específicos descritos na Quadro 2. Para cada reação utilizou-se 12,5µl da GoTaq® Green Master Mix (Promega, EUA), 1µl de cada *primer* específico a 10µM, 8,5µl de água livre de nucleases e 2µl de cDNA. As condições da PCR foram: 95°C por 2min; 35 ciclos de 95°C por 30s, 50°C por 30s, 72°C por 1min e um ciclo de extensão final a 72°C por 5min. Água livre de nucleases sempre foi utilizada como controle negativo.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% separados por uma corrente de 110 volts (V) por 30-40min. O produto gerado pelos *primers* específicos para GI tem 96 pares de base (pb) e o de GII tem 98pb. As bandas foram observadas por um transiluminador de luz ultravioleta.

Quadro 2 – *Primers* utilizados no estudo para detecção de NoV GI e GII.

<i>Primer</i>	Sequência	Genogrupo	Referência
JJV1F	GCC ATG TTC CGI TGG ATG	GI	Jothikumar <i>et al.</i> (2005)
JJV1R	TCC TTA GAC GCC ATC ATC AT	GI	Jothikumar <i>et al.</i> (2005)
JJV2F	CAA GAG TCA ATG TTT AGG TGG ATG AG	GII	Jothikumar <i>et al.</i> (2005)
COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	GII	Kageyama <i>et al.</i> (2003)

Fonte: Elaborado pela autora.

5.8 CLONAGEM GÊNICA

Foram clonados fragmentos específicos dos NoV GI (amostra da FIOCRUZ/RJ) e GII (uma das amostras do LACEN/PE). A estratégia para clonagem desses fragmentos foi amplificar inicialmente as regiões específicas que serviriam como alvo para clonagem com os *primers* da Tabela 2. Para isso, foram realizadas duas PCRs convencionais (uma para cada genogrupo) com três tubos de reações de volume final de 50µl cada. Essas reações foram processadas juntas ao final da PCR com o objetivo de aumentar a concentração dos produtos gerados. Para cada reação foram adicionados 25µl da GoTaq® Green Master Mix (Promega, EUA), 2µl de cada *primer* específico a 10µM e 17µl de água livre de nucleases. Foi utilizado um volume de 4µl de cDNA de cada controle positivo por tubo de reação. As condições da PCR foram as mesmas descritas no item 5.6.

Em seguida, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. As bandas geradas foram cortadas com bisturis estéreis, reunidas em microtubo de 1,5ml (3 bandas do GI e 3 bandas do GII) e purificadas utilizando o Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare Life Sciences, EUA), seguindo recomendações do fabricante.

A segunda etapa da estratégia de clonagem foi a ligação do alvo molecular purificado ao vetor de clonagem. O DNA purificado foi dosado em espectrofotômetro e ligado ao vetor de clonagem pGEM®-T Easy (Promega, EUA), nas proporções de 1:3 e 1:8 vetor:inserto, conforme recomendações do fabricante. Após a ligação, a etapa seguinte foi a transformação bacteriana por eletroporação. Para isso, 5µl de cada ligação foram misturados gentilmente e no gelo com 50µl de células bacterianas do tipo eletrocompetentes (Dh10B). Em seguida, as misturas foram transferidas para cubetas e submetidas ao processo de eletroporação: 5 pulsos de 2000V por 0,99s. Então, 950µl de meio SOC foi utilizado para remover a mistura da cubeta. Para promover o crescimento bacteriano, todo volume foi transferido para um microtubo de 1,5ml e incubado por 1h a 37°C com agitação constante de 200rpm. Ao final, 50µl das transformações foram plaqueadas em meio de cultura seletivo Luria-Bertani broth, acrescido do antibiótico ampicilina (LB/Amp) com ágar, acrescido também das substâncias indicadoras IPTG e X-GAL nas quantidades de 10µl e 20µl, respectivamente. As placas foram incubadas de um dia para o outro em uma estufa a 37°C. O vetor codifica um gene de resistência à ampicilina e o gene LacZ.

No dia seguinte, foram observadas colônias brancas na placa: quando há a ligação do inserto com o vetor, as colônias expressam cor branca devido a não expressão do seu gene LacZ, que consome o X-GAL e é interrompido durante o processo de clonagem. Foram selecionadas

oito colônias (clones) do NoV GI e 10 do NoV GII. Realizamos duas (GI e GII) PCRs de colônias de todos os clones selecionados para primeira confirmação. Essas reações ocorreram conforme item 5.6, com diferença apenas no tempo de desnaturação inicial, 10min, para lisar mais eficientemente as colônias. Além disso, esses clones foram repicados em novas placas de LB/Amp que ficaram de um dia para o outro a 37°C para a próxima etapa.

A etapa final da clonagem foi a minipreparação das colônias repicadas utilizando o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, EUA). Os DNA plasmidiais obtidos após minipreparação foram quantificados com espectrofotômetro e confirmados por digestão enzimática utilizando 0,5µl das enzimas SacII e SpeI, selecionadas com auxílio do programa ApE, 1µl de cada DNA plasmidial, 1µl do *buffer* CurtSmart e água para um volume final de 10µl, e incubadas a 37°C por 4h e, em seguida, 65°C por 20min. Além da confirmação por PCR de colônia e digestão enzimática, todos os clones também foram confirmados por sequenciamento de Sanger utilizando os *primers* da Tabela 2.

5.9 TRANSCRIÇÃO *IN VITRO*

Os DNAs plasmidiais foram transcritos em RNA para se obter controles mais fidedignos em relação às amostras virais, tendo em vista que o material genético do NoV é RNA de fita simples.

A primeira etapa da transcrição *in vitro* é a linearização dos DNAs plasmidiais ligados ao vetor obtidos após minipreparação em 5.7. A enzima selecionada para essa etapa, com auxílio do ApE, foi a SacII e a linearização ocorreu de forma semelhante à digestão enzimática de 5.7: para cada digestão de volume final 50µl, foram utilizados 9µl de cada minipreparação, 1µl da SacII e 5µl do *buffer* CutSmart, completando o volume com água livre de nucleases. O produto digerido foi corrido em gel de agarose 1% e as bandas visualizadas foram cortadas e purificadas com o Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare Life Sciences, EUA).

Duas transcrições *in vitro* com volume de 20µl cada foram realizadas para cada clone, utilizando o kit MEGAscript® SP6 Transcription Kit (Ambion, Life Technologies Corporation, CA, EUA), seguindo recomendações do fabricante sob algumas modificações padronizadas pela equipe do LAVITE (aumento no volume do DNA purificado e o aumento do tempo de incubação). Foram adicionados para cada reação: 8µl do DNA linear purificado, 2µl do tampão 10x Sp6 do kit, 2µl de cada ribonucleotídeo fosfatado (rNTP) (ATP, GTP, CTP e UTP) e 2µl da enzima Sp6 e incubados em banho seco por 6h a 37°C. Em seguida, os RNAs transcritos

foram tratados com a enzima TURBO™ DNase (Ambion, Life Technologies Corporation, CA, EUA) usando um volume de 5µl por reação e incubados 37 °C por 30min, para evitar contaminações com DNA. Os transcritos foram tratados ainda com 115µl de água livre de nucleases e 15µl de acetato de amônia, precipitados com 310µl de etanol, ressuspendidos e eluídos com 36µl de água livre de nucleases e 4µl da enzima RNaseOut® (Invitrogen, CA, EUA). Os RNAs gerados foram armazenados em alíquotas de 3µl a -80°C.

5.10 RT-qPCR

Foi padronizada uma nova RT-qPCR utilizando a metodologia de SYBR® Green e *primers* descritos anteriormente.

5.10.1 Condições da RT-qPCR

A RT-qPCR foi realizada utilizando o GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega, EUA), que permite a RT e qPCR na mesma reação (*one step*). Para cada reação com volume final de 20µl, foram acrescentados 10µl do GoTaq® qPCR Master Mix 2X, 0,6µl dos *primers* específicos a 10µM (Tabela 2), 0,18µl da CXR *Reference dye*, 0,4µl da enzima GoScript® RT Mix, 6,22µl de água livre de nucleases e 2µl de RNA. As reações foram processadas no termociclador 7500 Real-time PCR System e analisadas através do *software* ABI Prism 7500 SDS (Applied Biosystems, CA, US). As condições da RT-qPCR foram: RT a 50°C por 30min; desnaturação inicial a 95°C por 10min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 10s, 60°C por 30s e 72°C por 30s; e finalizada com a curva de *melting*. Todas as amostras foram testadas em duplicata e controles negativo (água livre de nuclease) e positivo (RNA transcrito, em várias diluições – ver item 5.10.2 - Curva padrão) foram sempre utilizados.

5.10.2 Curva padrão

A fim de determinar o limite de detecção da técnica, bem como padronizar a RT-qPCR para detecção de NoV, foram construídas duas curvas padrão com diluições seriadas de fator 10 a partir do RNA transcrito dos clones de GI e GII. A curva padrão também funciona como controle positivo e em todas as reações foram colocados 5 pontos da diluição da curva. Para construção das curvas de GI e GII, seus respectivos RNAs foram dosados e aplicados na seguinte fórmula para estabelecimento do ponto inicial:

$$\frac{\text{Concentração RNA (g/}\mu\text{l)}}{\text{Comprimento Transcrito (pb)} \times 340} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Após cálculos, foi possível determinar que o transcrito de GI continha $4,85 \times 10^{12}$ cópias de RNA/ μl e o de GII $4,79 \times 10^{12}$ cópias de RNA/ μl . Com isso, as curvas foram realizadas diluindo-se seriadamente cada RNA em água livre de nucleases, com variação de 10^{11} a 10^1 cópias de RNA/ μl . As curvas foram aplicadas na reação de RT-qPCR e tiveram seus parâmetros avaliados (eficiência, *slope* e r^2).

5.11 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE HUMANOS

Perante anuência (Anexo A), foi desenvolvido um projeto em parceria com o LACEN/PE afim de resgatar amostras de pacientes com diarreia que foram recebidas pelo serviço de diagnóstico de diarreias agudas virais do referido laboratório. Essas amostras foram provenientes de todo Estado de PE, no período de Maio de 2014 a Outubro de 2017, e foram encaminhadas ao serviço juntamente com uma ficha de notificação e cadastro do paciente no Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL), sistema brasileiro *online* que contém informações de todos os pacientes cujo diagnóstico será realizado nos laboratórios centrais/de referência do país.

Para nosso estudo, as amostras foram encaminhadas em caixas térmicas sob refrigeração do LACEN ao LAVITE/IAM na forma de suspensão fecal, já processadas pela equipe que realizou o diagnóstico no LACEN. Esse diagnóstico foi realizado por ELISA, utilizando o kit RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha). Amostras selecionadas tiveram o RNA extraído da suspensão fecal conforme item 5.3.

5.12 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

Para sequenciamento do genoma completo por NGS, foram desenhados *primers* após o alinhamento de sequências de NoV GII. Devido à maior prevalência desse genogrupo, optamos por padronizar inicialmente a estratégia do NGS exclusivamente para ele. Os *primers* desenhados estão descritos na Tabela 3. Para amplificação do genoma completo, padronizamos uma RT, conforme protocolo do item 5.5, com *primers* randômicos para obtenção de um cDNA que pudesse ser amplificado por todos os oligonucleotídeos desenhados, cobrindo todo o

genoma. A melhor condição de amplificação obtida foi quando o cDNA foi sintetizado utilizando uma soma dos seguintes *primers*: randômicos fornecidos pelo kit + COG2R (Tabela 2) e 15R (Quadro 3).

Quadro 3 – *Primers* utilizados no sequenciamento do genoma completo de NoV GII.

<i>Primer</i>	Sequência	Posição no genoma
1F	GTGAATGATGATGGCGTCKAAMGACG	1
1R	AATGCCGTATTGGTCGCATCTGG	549
2F	GTAAAAGGATACCCCTCCCCACC	407
2R	GGAGCGATCATAGCAGACACATCTGG	1207
3F	ACCCACCATGGATGATTCCAAAATTAAGAAGG	972
3R	CGTTGATTGTCCCCTATGTCAGG	1629
4F	GACAACCCTGCTGAAAGATAAAGACAGCC	1449
4R	TCTTCATCACTCCTTCCCATGTGGG	2260
5F	AGGAATTGGCTGACACATGCCC	1925
5R	TGATGGTGGTGCAGGGCTCC	2670
6F	TTGGCAATCAACTGAAAGGTGTGAAAACC	2443
6R	AGTCTTCTCCGTGGCCTTGGC	3166
7F	GCAAGAACAAGACTGGCCGTGG	2973
7R	CCATTCTAGCTGCGAGGGGC	3690
8F	GTCATACCTAAGGGTATAACAGAGGCCTTTGG	3472
8R	TCTCTCATGACTTGTTGCAGGGAAGG	4142
9F	AACACGCCCTTCCACCAGG	4041
9R	TCGGATCATGGTGGATAAAGTCAGAGCC	4533
10F	TGACTTATCCACCATGATCCGATGTGC	4518
10R	TATCTGTGCTGACAATCTNCATCATCACC	5003
11F	AGTGGAAATCCATCGCCCACTGG	4872
11R	GGCTTGGACAAAATTTGTTCTAATCCAGGG	5658
12F	CTGGCTCCCAGTTTTGTGAATGAAGATGG	5460
12R	TGGAAGAAGTTATTCCTAACATCAGGGAGTGG	6010
13F	ACTTTGGAACCTGTTTTGATACCACTCCC	5960
13R	ACCAAAGACCCTTCCCTGAAAGTCAGG	6577
14F	AGTGGCATTGTGCTTTCAGGGG	6377
14R	ATAGAAATGTTGCACCCACTCTTGGGG	7000
15F	ATACAAACCTTGCCCCTTCTGTTGCTCC	6840
15R	TCAGCAGGGGAAAAGCCGCC	7550
16F	TTGCAGGCCAGGTCCAGG	7440
16R	TGTTAAACGCAGGTGTCCAGGAGTCC	8040

Fonte: Elaborado pela autora.

As reações de sequenciamento foram realizadas em um Sequenciador de Nova Geração, modelo MiSeq-Illumina, disponibilizado pelo Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM/FIOCRUZ. Resumidamente, as amostras positivas para NoV GII foram amplificadas por PCR convencional utilizando duas misturas (*pools*) dos *primers* da tabela 3 a 10 μ M. O *pool A* contém os pares de *primers* de 1 a 8 e o *pool B* contém os *primers* de 9 a 16. Para cada amostra, foi feito um mix com o *pool A* e outro com o *pool B*, contendo cada um 12,5 μ l de GoTaq® Green Master Mix (Promega, EUA), 1,5 μ l do *pool* e 9 μ l de água livre de nucleases. Cada reação ocorre com 2 μ l de cDNA randômico sintetizado com os 3 *primers* descritos anteriormente. As condições da PCR são: 95°C por 2min; 45 ciclos de 95°C por 30s, 65°C por 5min e um ciclo de extensão final a 72°C por 7min.

Após amplificação, os produtos de PCR dos dois *pools* foram unificados e purificados com 90 μ l de *beads* Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, EUA), conforme recomendações do fabricante. Os produtos de PCR purificados são dosados no fluorômetro Qubit (ThermoFisher®, Waltham, EUA), utilizando o Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher®, Waltham, EUA). As bibliotecas foram preparadas com o Nextera XT Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) utilizando 2ng do DNA de cada amostras. Resumidamente, um *pool* de transposases foi utilizado para fragmentar o DNA e obter uma biblioteca para sequenciamento ligada a adaptadores. Os oligonucleotídeos utilizados como *index* foram adicionados por PCR conforme recomendação do fabricante. Cada amostra foi indexada individualmente e todas as amostras são unidas no final de maneira a gerar uma biblioteca misturada onde cada sequência é lida em uma única corrida no Illumina MiSeq, utilizando o MiSeq Reagent Kit v3, 2 x 150 pares de base.

Os dados produzidos no sequenciador são armazenados em arquivos texto no formato FASTQ. As análises feitas em resumo são: análise de qualidade e limpeza dos dados com o Trimmomatic. Em seguida, os dados são utilizados para montagem, alinhamento e mapeamento contra sequências conhecidas, com o Bowtie2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012; LANGMEAD *et al.*, 2018). Posteriormente, podem ser realizadas análises de predição gênica, anotação funcional, análise de variabilidade, contagem de transcritos, identificação de espécies, com o IGV (ROBINSON *et al.*, 2017).

5.13 SEQUENCIAMENTO DE SANGER

Para genotipagem das cepas circulantes em PE, foi utilizado o sequenciamento de Sanger com os *primers* 11F e 11R, descritos na Tabela 3. Esses *primers* anelam na região mais

conservada do genoma e usualmente utilizada para genotipagem (junção da região da polimerase/ORF1 com a codificadora de VP1/ORF2).

Inicialmente, o cDNA foi sintetizado com *primers* randômicos, conforme descrito em 5.11. Em seguida, ocorreu a amplificação do cDNA por PCR convencional utilizando-se 50µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega, EUA), 4µl do *primer* 11F 10µM, 4µl do *primer* 11R 10µM e 34µl de água livre de nucleases, com 8µl de cDNA para volume final de 100µl. Após amplificação, as amostras foram purificadas com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, EUA) e dosadas no NanoDrop 2000 (ThermoFisher®, Waltham, EUA). Os DNAs foram normalizados para mesma concentração de 20ng/µl e enviados ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM para sequenciamento, sob responsabilidade das Dr^a Cássia Docena e Dr^a Viviane Carvalho, juntamente com o conjunto de *primers* 11F+11R. No NPT, o sequenciamento ocorreu conforme instruções do BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, EUA), no ABR Prism Genetic Analyzer 3500XL.

As análises do sequenciamento foram realizadas usando o *software* DNASTAR (Madison, Wisconsin, EUA), utilizando os programas *SeqMan* e *EditSeq*, além do auxílio do *software* A plasmid Editor (ApE). O alinhamento múltiplo foi realizado com ClustalW e a árvore filogenética foi construída com o método de máxima verossimilhança e o modelo de Tamura-Nei. Essas análises foram realizadas no *software* MEGA X, com os parâmetros padrão definidos no programa e o teste *bootstrap* com 1000 repetições (KUMAR *et al.*, 2018; TAMURA; NEI, 1993). Posteriormente, a árvore construída foi editada com o iTOL Tree (<https://itol.embl.de>).

5.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos em cada experimento foram testados quanto à normalidade e comparados utilizando o teste “*t-Student*” (2 tratamentos) ou ANOVA (mais de 2 tratamentos) seguida do apropriado pós-teste. Para criação dos bancos de dados e realização da análise estatística, foram utilizados os *softwares* Excel 2013 (Microsoft, EUA), GraphPad Prism 5.0 e IBM SPSS Statistics 22.0. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a primeira parte do projeto, com moluscos bivalves, não houve necessidade de obtenção de permissões junto à Comissão de biossegurança ou à Comissão de ética no uso de animais (CEUA), por não envolver o uso de microrganismos recombinantes nem de animais vertebrados. A “Lei Arouca” (Lei 11.794, de 08/10/2008) limita o seu âmbito de incidência a animais vertebrados vivos, excluindo os organismos invertebrados como os moluscos que foram utilizados nesse estudo.

Já para as análises de amostras de humanos, o projeto foi submetido à Plataforma Brasil e teve parecer aprovado junto ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do IAM/FIOCRUZ, sob número 2.840.085, CAAE: 92477718.3.0000.5190 (Anexo B). O projeto não ofereceu riscos importantes para o paciente, visto que as amostras já haviam sido coletadas previamente para encaminhamento ao LACEN/PE. Além disso, trata-se de amostras de fezes que foram emitidas espontaneamente devido à sintomatologia dos pacientes do estudo (diarreia).

7 RESULTADOS

Aqui se inicia a sessão de descrição dos resultados obtidos no desenvolvimento dessa tese.

7.1 DETECÇÃO DE NOROVÍRUS EM MOLUSCOS BIVALVES EM PERNAMBUCO

No primeiro tópico, serão abordados os resultados obtidos a partir da análise dos moluscos bivalves do litoral pernambucano.

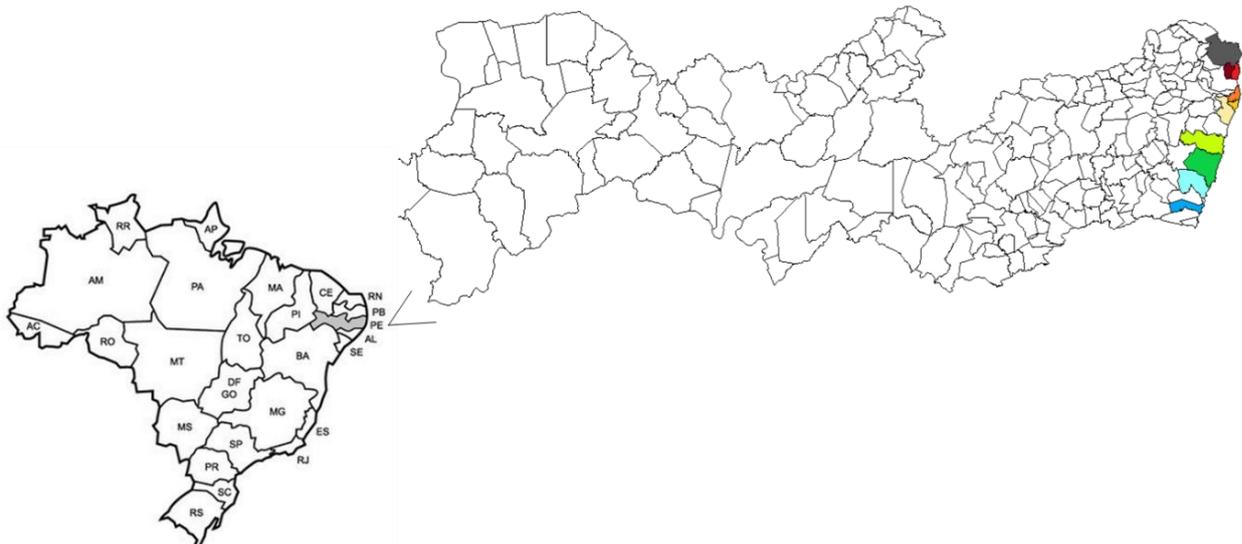
7.1.1 Obtenção dos moluscos bivalves

Para obtenção dos moluscos em PE, foram realizadas coletas das espécies disponíveis em regiões específicas do estado.

7.1.1.1 Área de estudo

As coletas foram realizadas em todo litoral pernambucano, sendo visitados os municípios de Goiana, Itapissuma, Itamaracá, Paulista, Olinda, Recife, Cabo de Santo Agostinho, Ipojuca, Sirinhaém e Tamandaré (Figura 16).

Figura 16 – Municípios litorâneos de PE visitados para coleta.

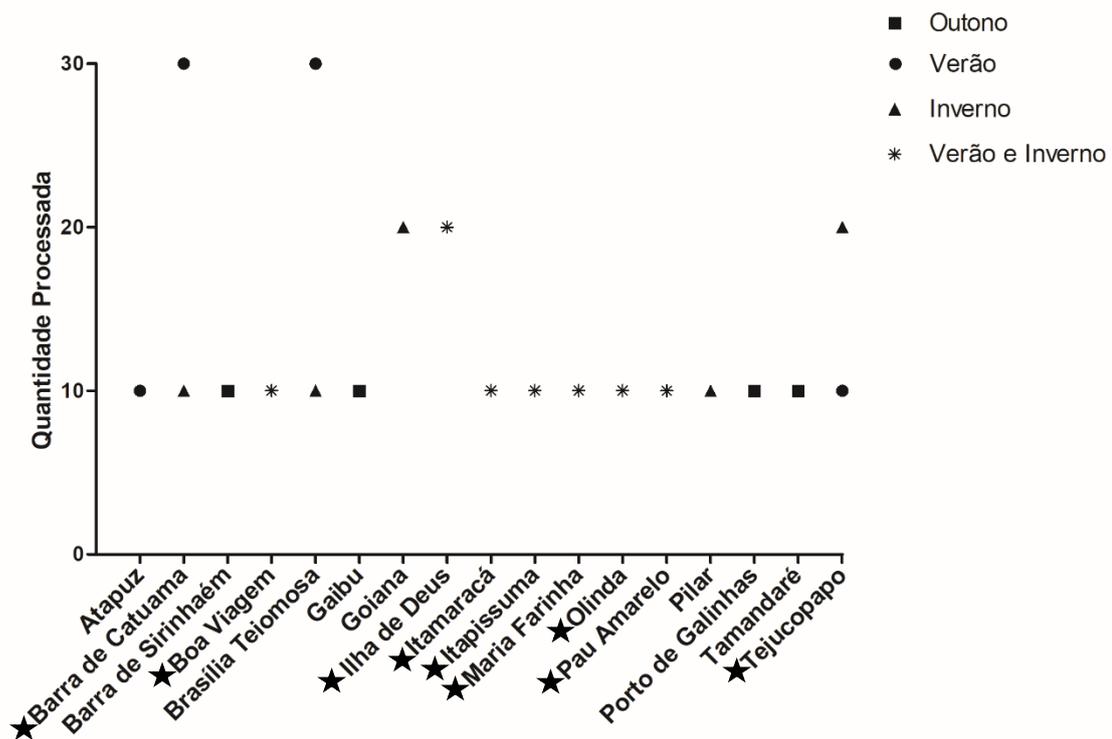


Fonte: Elaborado pela autora a partir do Google Imagens.

Legenda: Municípios de Goiana (cor cinza), Itapissuma (cor vinho), Itamaracá (cor vermelho), Paulista (cor laranja), Olinda (cor amarelo), Recife (cor bege), Cabo de Santo Agostinho (cor verde claro), Ipojuca (cor verde escuro), Sirinhaém (cor azul claro) e Tamandaré (cor azul escuro).

As praias participantes do estudo, as estações do ano onde foram visitadas para coleta e a quantidade de moluscos coletada por área estão descritas na Figura 17. No litoral Norte (Barra de Catuama, Boa Viagem, Brasília Teimosa, Ilha de Deus, Itamaracá, Itapissuma, Maria Farinha, Olinda, Pau Amarelo e Tejucoapapo) as coletas foram realizadas tanto no inverno quanto no verão, para comparar a sazonalidade da distribuição do NoV.

Figura 17 – Locais de coleta dos moluscos, quantidade coletada e estação do ano.



Fonte: elaborada pela autora.

Nota: Praias destacadas com uma estrela foram visitas em duas estações: verão e inverno.

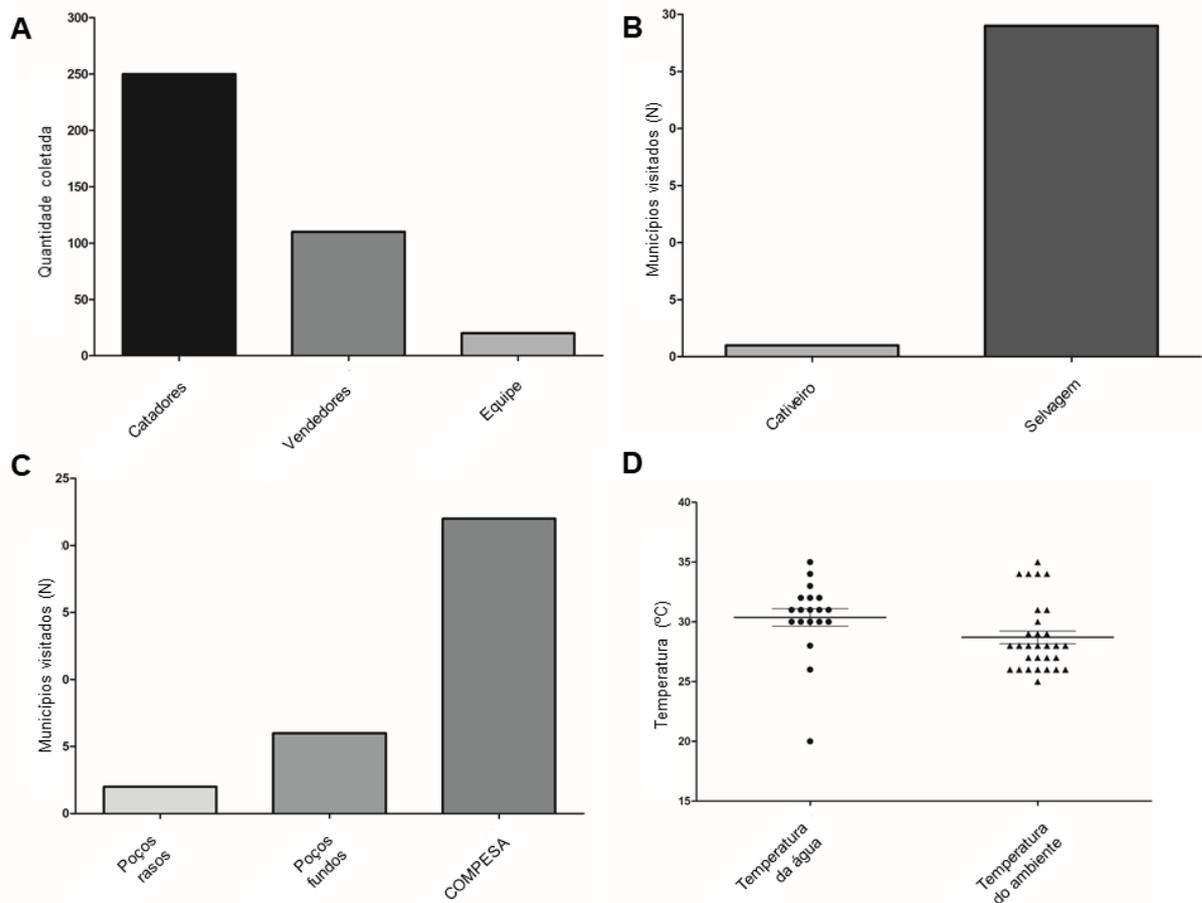
Legenda: As amostras foram coletadas nas estações de outono, inverno e verão, sendo que no litoral Norte as áreas foram visitadas no inverno e verão para comparar a sazonalidade da distribuição do NoV.

7.1.1.2 Coleta dos moluscos e espécies estudadas

Foram coletados um total de 380 moluscos, sendo 260 ostras e 120 sururus. Desses, 250 foram coletados através de catadores, 110 vendedores ambulantes e 20 pela própria equipe (Figura 18A). Em cada ponto de coleta, um questionário foi preenchido com algumas informações a cerca da forma de coleta e dados demográficos da região (Apêndice A). Através dele, foi possível observar que a maioria (96,70%) dos nossos moluscos eram selvagens, ou seja, não eram criados em cativeiro (Figura 18B). Além disso, foi possível determinar a origem

da água consumida pela população do local da coleta, onde 73,30% era da Companhia Pernambucana de Saneamento (COMPESA), 20% de poços profundos e 6,70% de poços rasos (Figura 18C). As temperaturas da água e ambiente também foram medidas em todos os pontos de coleta. A temperatura média do ambiente obtida foi 28,70°C (25-35°C ± 2,092) e a da água 30,37°C (20-35°C ± 3,201) (Figura 18D).

Figura 18 – Informações sobre a coleta e dados demográficos da região.



Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: (A) Responsável pela coleta do molusco. (B) Origem do molusco coletado. (C) Origem da água consumida pela população local. (D) Temperaturas médias da água e ambiente dos pontos de coleta visitados.

7.1.2 Processamento dos moluscos e extração do RNA viral

Os 380 moluscos foram limpos, abertos, dissecados individualmente e suas porções gástricas unidas em tecidos com 1-2g. No final, obteve-se um total de 233 amostras teciduais de moluscos processadas. O RNA foi extraído de todas as amostras, gerando 233 RNAs para análise por RT-qPCR, que foram armazenados a -80°C.

7.2 DETECÇÃO DE NOROVÍRUS EM MOLUSCOS BIVALVES NA PARAÍBA

Nesse segundo tópico observaremos os resultados obtidos em relação aos moluscos coletados na PB.

7.2.1 Obtenção dos moluscos bivalves

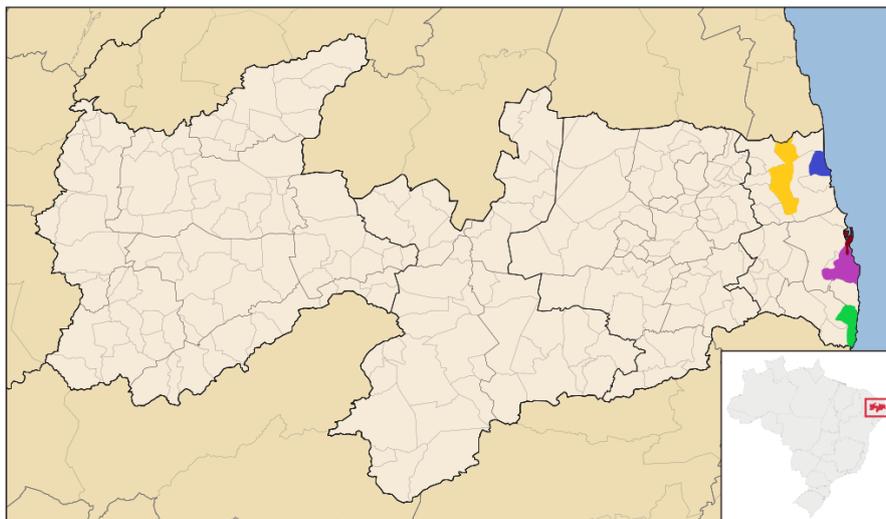
Para obtenção dos moluscos na PB, foram realizadas coletas das espécies disponíveis em regiões específicas do estado.

7.2.1.1 Área de estudo

As coletas foram realizadas em vários pontos do litoral paraibano, de acordo com a disponibilidade de moluscos na área. Os catadores relataram que os moluscos estudados não eram mais encontrados em alguns pontos que inicialmente planejamos coletar, devido à presença de doenças como a Síndrome da Mancha Branca, que dizimou as populações desses animais nesses pontos.

As coletas foram realizadas nos seguintes municípios da PB: Cabedelo (bairro Renascer); Pitimbú (praia de Acaú); Mamanguape; Baía da Traição (cativeiro) e nos mercados Públicos de Mangabeira e da Torre na cidade de João Pessoa. Esses municípios estão em destaque na Figura 19.

Figura 19 – Municípios da PB visitados para coleta.



Fonte: Elaborada pela autora a partir do Google Maps.

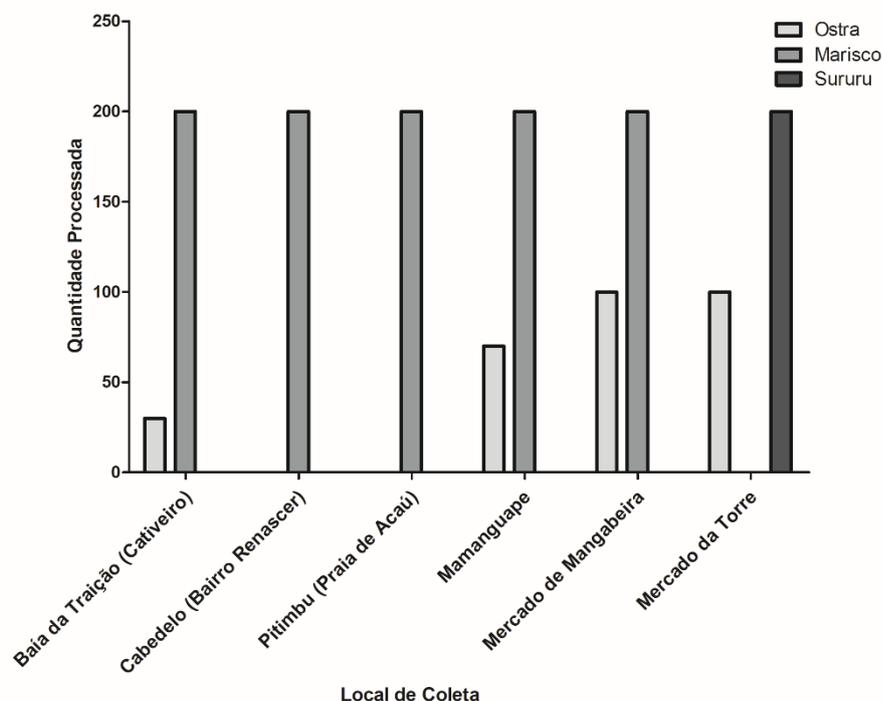
Legenda: Cabedelo (cor de vinho); Pitimbú (cor verde); Mamanguape (cor amarela); Baía da Traição (cor azul) e nos mercados Públicos de Mangabeira e da Torre na cidade de João Pessoa (cor roxa).

7.2.1.2 Coleta dos moluscos e espécies estudadas

Ao todo, foram coletados 1500 moluscos, sendo 1000 mariscos, 300 ostras e 200 sururus. Na Baía da Traição, foram coletados 230 moluscos (30 ostras + 200 mariscos), em Cabedelo e Pitimbu 200 mariscos cada, em Mamanguape 270 moluscos (70 ostra + 200 mariscos), no Mercado da Mangabeira 300 moluscos (100 ostras + 200 mariscos) e no Mercado da Torre 300 moluscos (100 ostras + 200 sururus).

As quantidades de moluscos coletadas por área estão descritas na Figura 20.

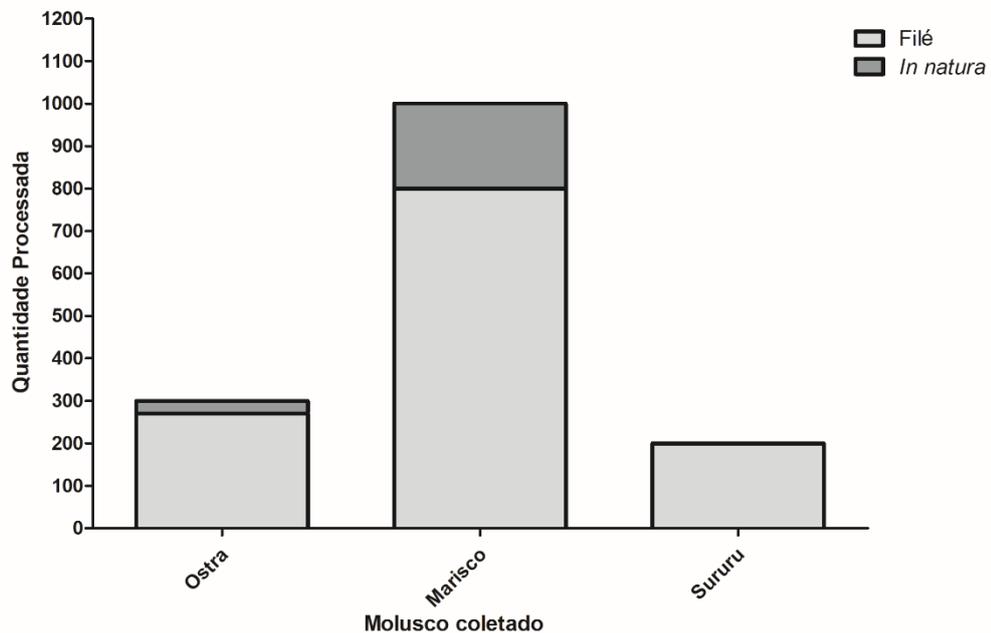
Figura 20 – Locais de coleta dos moluscos e quantidade coletada em cada localidade.



Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Amostras de ostra, marisco e sururu foram coletadas nos locais expressos na figura, no Estado da Paraíba.

Dessas amostras, 1270 foram coletadas na forma de filé (já abertas e pré-processadas) e 230 ainda na casca (*in natura*). A distribuição do estado do molusco no momento da coleta está descrita na Figura 21.

Figura 21 – Estado do molusco no momento da coleta.

Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Amostras de ostra, marisco e sururu foram coletadas na forma de filé ou *in natura*.

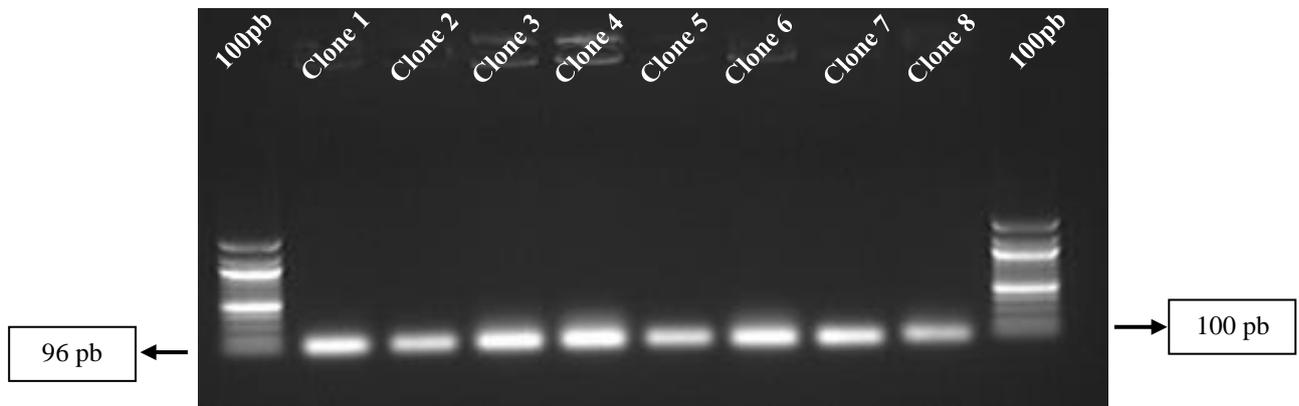
7.2.2 Processamento dos moluscos e extração do RNA viral

Os moluscos foram limpos e abertos (quando necessário), e dissecados individualmente. Suas porções gástricas unidas de maneira a formar porções com 1-2g. No final, obteve-se um total de 230 amostras teciduais de moluscos processadas. O RNA foi extraído de todas as amostras, gerando 230 RNAs para análise por RT-qPCR, que foram armazenados a -80°C.

7.3. PADRONIZAÇÃO DA RT-qPCR

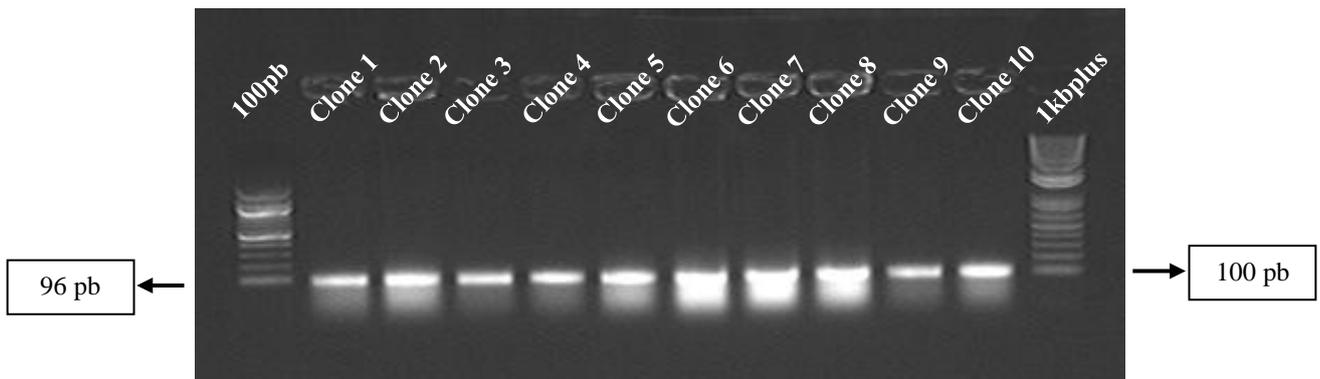
7.3.1 Clonagem gênica

Os clones dos dois alvos moleculares desse estudo foram confirmados por PCR de colônia, onde se observou bandas de 96pb para NoV GI e 98pb para NoV GII (Figura 22 e 23).

Figura 22 – Confirmação da clonagem de NoV GI por PCR de colônia.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR das 8 colônias selecionadas mostrando as bandas com 96pb, correspondentes ao fragmento específico de NoV GI, e o marcador de peso molecular de 100pb.

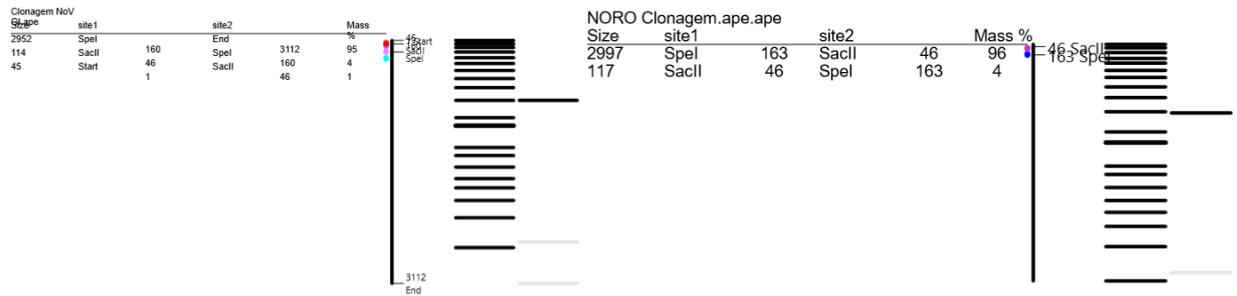
Figura 23 – Confirmação da clonagem de NoV GII por PCR de colônia.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR das 10 colônias selecionadas mostrando as bandas com 98pb, correspondentes ao fragmento específico de NoV GII, marcador de peso molecular de 100pb e 1kb plus.

Os DNAs plasmidiais obtidos da clonagem dos dois alvos foram submetidos ao processo de digestão enzimática para mais uma confirmação da clonagem. As enzimas para digestão foram selecionadas com auxílio do programa ApE e as bandas esperadas estão demonstradas na Figura 24. Nem todos os clones foram confirmados por essa metodologia (Figura 25 e Figura 26).

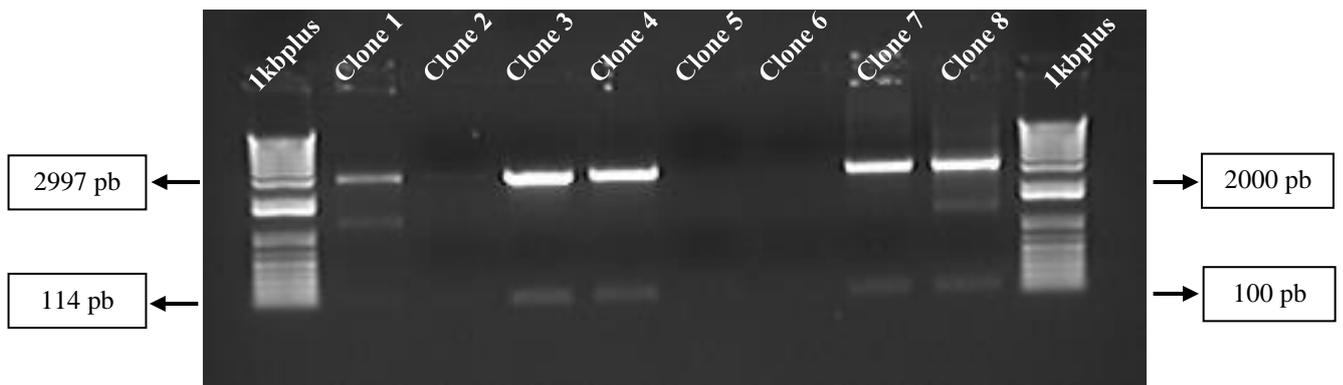
Figura 24 – Padrão de bandas esperadas para a digestão enzimática de NoV GI e GII.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Padrão de bandas esperadas na digestão enzimática realizada com auxílio do programa ApE para os DNAs plasmidiais clonados de NoV GI (à esquerda) e GII (à direita).

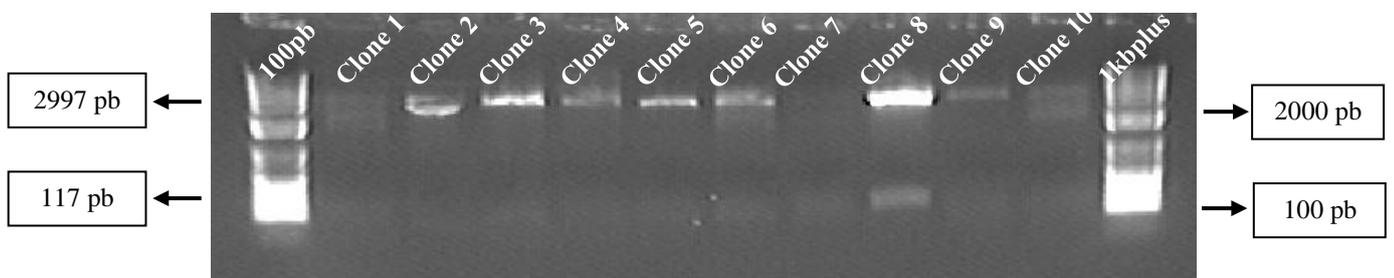
Figura 25 – Confirmação da clonagem de NoV GI por digestão enzimática.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão enzimática das 8 colônias selecionadas mostrando as bandas esperadas com a utilização das enzimas selecionadas pelo ApE e o marcador de peso molecular de 1kb plus.

Figura 26 – Confirmação da clonagem de NoV GII por digestão enzimática.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão enzimática das 10 colônias selecionadas mostrando as bandas esperadas com a utilização das enzimas selecionadas pelo ApE e o marcador de peso molecular de 1kb plus.

Todos os clones também foram sequenciados e as sequências obtidas foram analisadas com auxílio do ApE e da ferramenta *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn). A qualidade das sequências dos clones foram avaliadas e o percentual de similaridade entre as sequências obtidas com as sequências virais. Todas as sequências foram condizentes com NoV GI e NoV GII, com 100% de identidade.

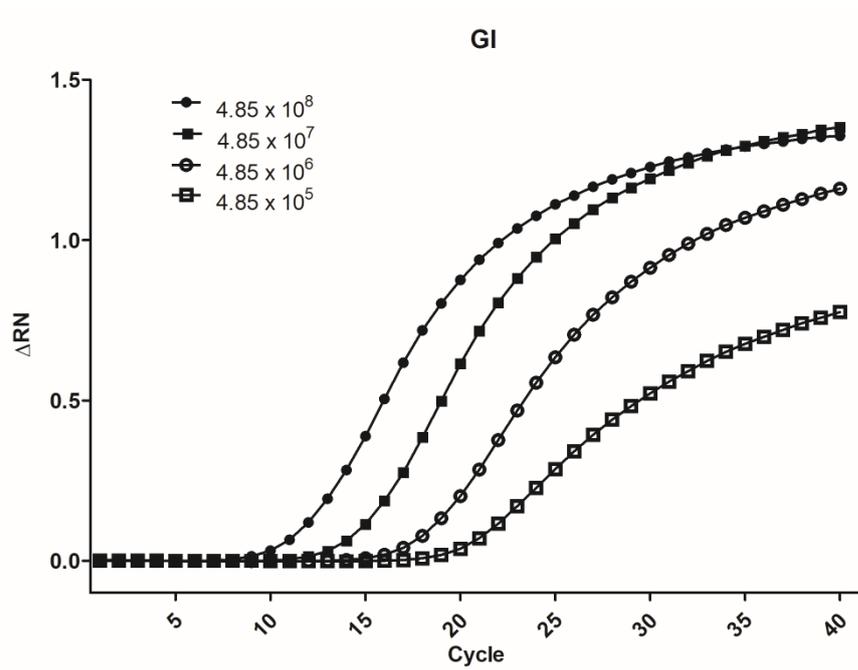
7.3.2 RT-qPCR

Para padronização e valiação da sensibilidade da nova RT-qPCR que seria utilizada na detecção do NoV genogrupos GI e GII, foram construídas uma curva padrão e uma de *spike* em ostras.

7.3.2.1 Curva padrão

As curvas padrão de NoV GI e GII foram construídas fazendo uma diluição seriada de fator 10 dos RNAs transcritos a partir da concentração de 10^{12} cópias/ μ l. Os pontos de 10^8 a 10^1 cópias/ μ l foram colocados nas reações, em duplicata. Para ambos genogrupos, ficou estabelecida a temperatura de *melting* específica entre 79-80°C. Para GI, observou-se a detecção até o ponto 10^4 , com Ct de 24, aproximadamente. Entretanto, a curva padrão começa a perder eficiência nesse ponto da diluição. Até 10^5 a curva apresentou parâmetros excelentes, com eficiência de 100%, *slope* de -3,313 e r^2 de 0,998 (Figura 27 e 28).

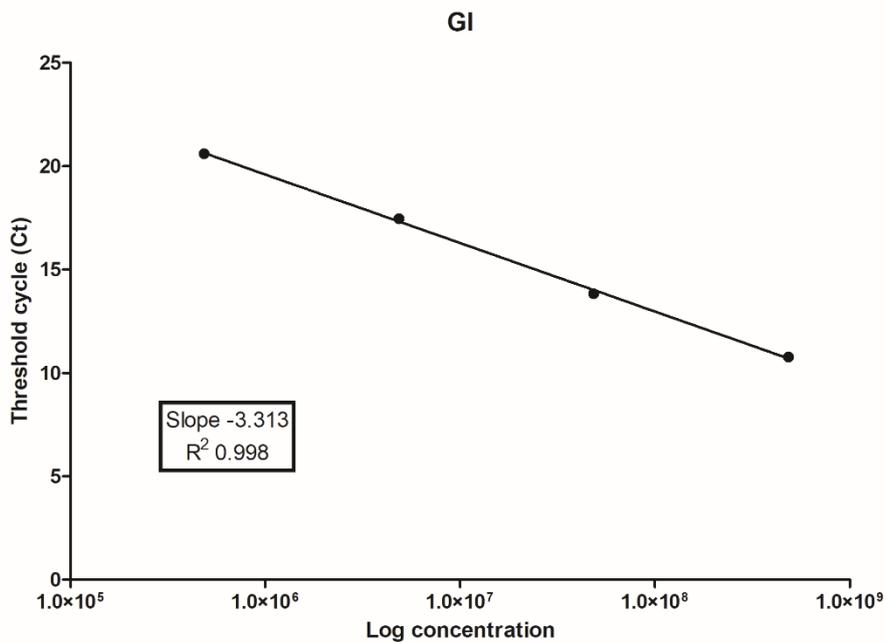
Figura 27 – Amplificação da curva padrão de NoV GI.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Gráficos de amplificação dos pontos da curva padrão de NoV GI, plotando o Ct e a magnitude do sinal de fluorescência gerado na reação (ΔRN).

Figura 28 – Curva padrão de NoV GI.

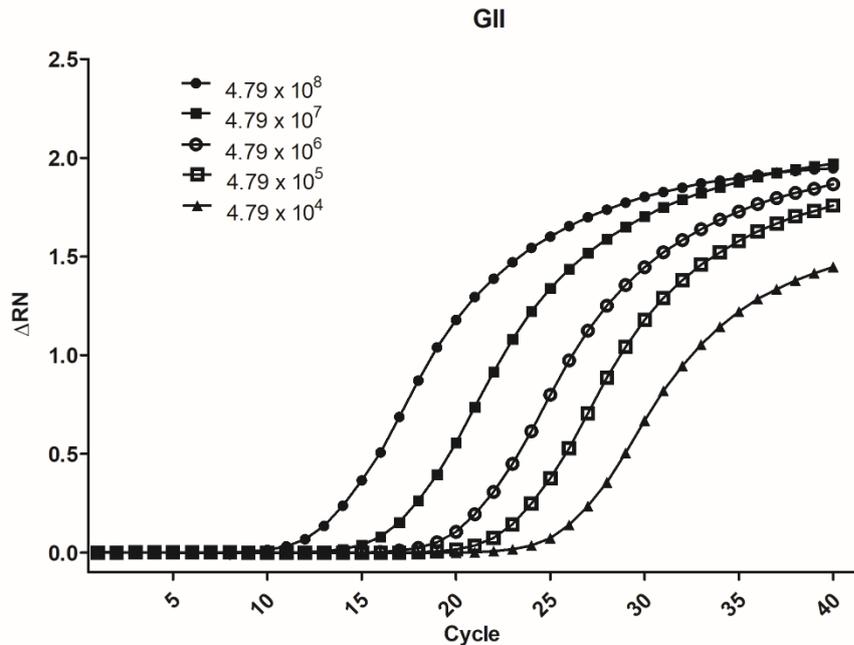


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Parâmetros da curva padrão calculados para avaliar a performance da RT-qPCR.

Já para GII, observou-se a detecção até o ponto 10^2 , com Ct de 27, aproximadamente. Entretanto, amplificações inespecíficas na curva de *melting* desse ponto da diluição começaram a aparecer. Até 10^4 a curva apresentou parâmetros excelentes, com eficiência de 105%, *slope* de -3,194 e r^2 de 0,993 (Figura 29 e 30).

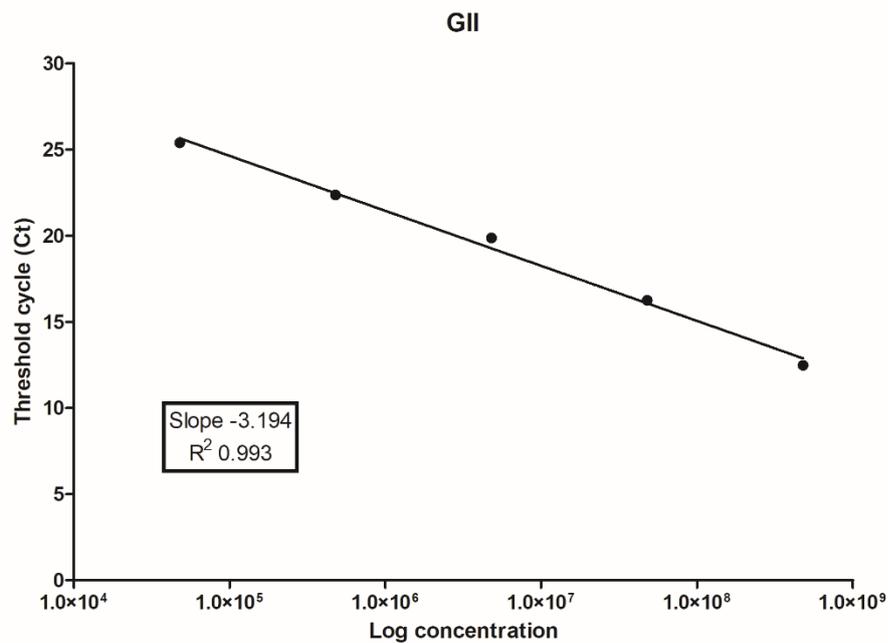
Figura 29 – Amplificação da curva padrão de NoV GII.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Gráficos de amplificação dos pontos da curva padrão de NoV GII, plotando o Ct e a magnitude do sinal de fluorescência gerado na reação (ΔRN).

Figura 30 – Curva padrão de NoV GII.



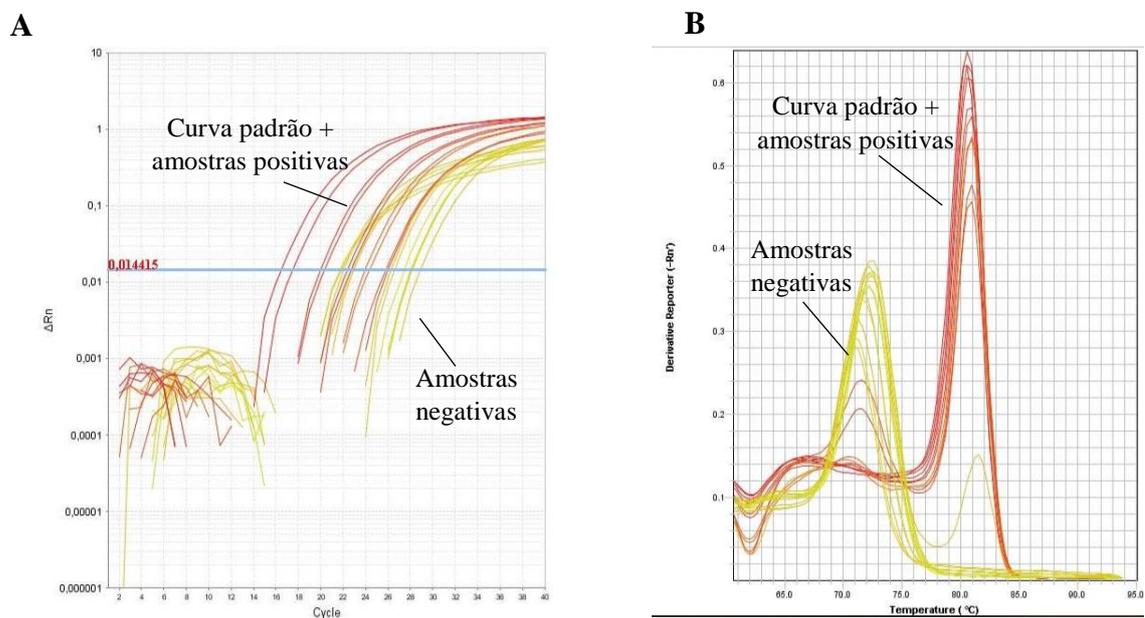
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Parâmetros da curva padrão calculados para avaliar a performance da RT-qPCR.

7.3.2.2 Spike das ostras

Para avaliar a sensibilidade da nossa técnica, bem como confirmar a ausência de inibidores nas amostras de moluscos e verificar a eficácia do protocolo de processamento, uma curva de contaminação artificial (*spike*) utilizando uma amostra positiva para NoV foi construída em amostras de tecido de ostras. Cerca de $2,7 \times 10^4$ cópias de RNA/ μ l foram utilizadas no ponto inicial da curva, que foi diluída até $2,7 \times 10^3$ cópias de RNA/ μ l. Após realização da RT-qPCR, pudemos observar que a técnica detectou até o ponto de $2,7 \times 10^3$ cópias de RNA/ μ l (Figura 31).

Figura 31 – Resultados da RT-qPCR do *spike* realizado em ostras.



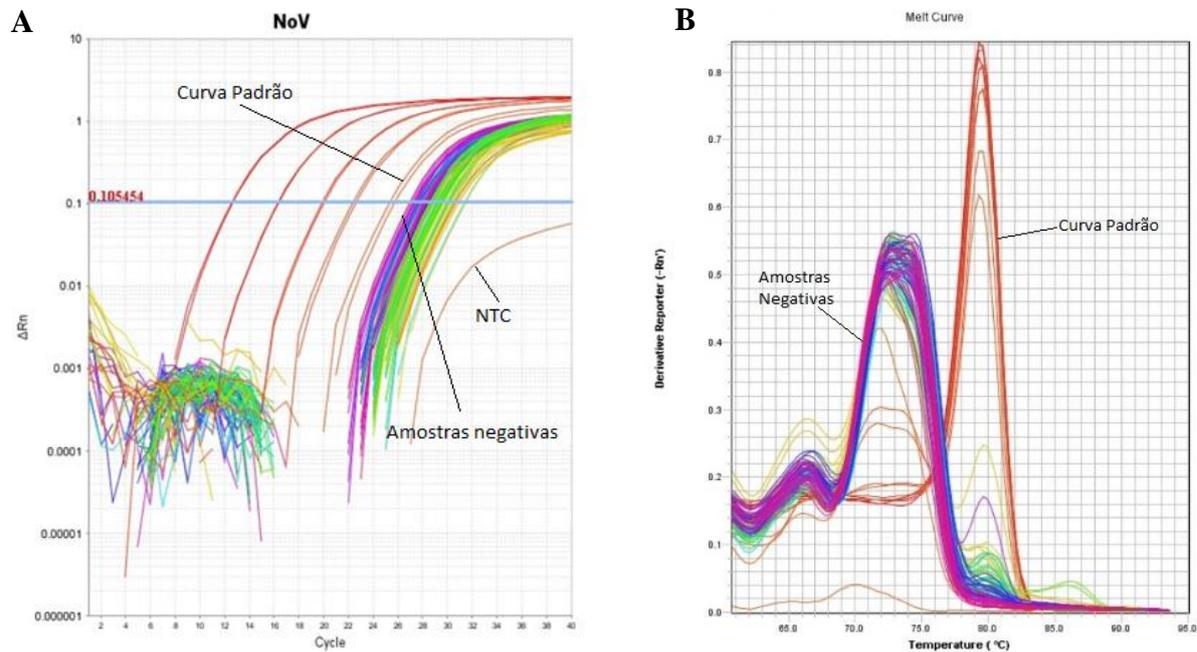
Fonte: elaborada pela autora.

Nota: Ao comparar as amostras de ostra contaminadas artificialmente à curva padrão, foi possível observar uma amplificação de até $2,7 \times 10^3$ cópias de RNA de NoV/ μ l.

Legenda: (A) Curva de amplificação das amostras artificialmente contaminadas juntamente com a curva padrão e controles negativos. (B) Curva de *melting* das mesmas amostras.

7.3.2.3 RNA dos moluscos

Com a técnica padronizada, os 463 RNAs obtidos dos moluscos bivalves coletados em PE e na PB foram submetidos à RT-qPCR e todos foram negativos, tanto para NoV GI e quanto para NoV GII, como ilustrado na Figura 32.

Figura 32 – RT-qPCR de algumas amostras de moluscos bivalves.

Fonte: elaborada pela autora.

Nota: Amostras com resultado negativo apresentam um *Ct* maior que o controle positivo, sendo essa uma das formas de caracterizar a negatividade das amostras. Outra forma é a temperatura de *melting*, que é em torno de 79-80° para as amostras positivas (controles) e inferior para as amostras negativas.

Legenda: (A) Comparação do *Ct* das amostras testadas com o controle positivo (curva padrão). (B) Comparação da temperatura de *melting* das amostras testadas com o controle positivo (curva padrão).

7.4 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOROVÍRUS EM AMOSTRAS DE HUMANOS

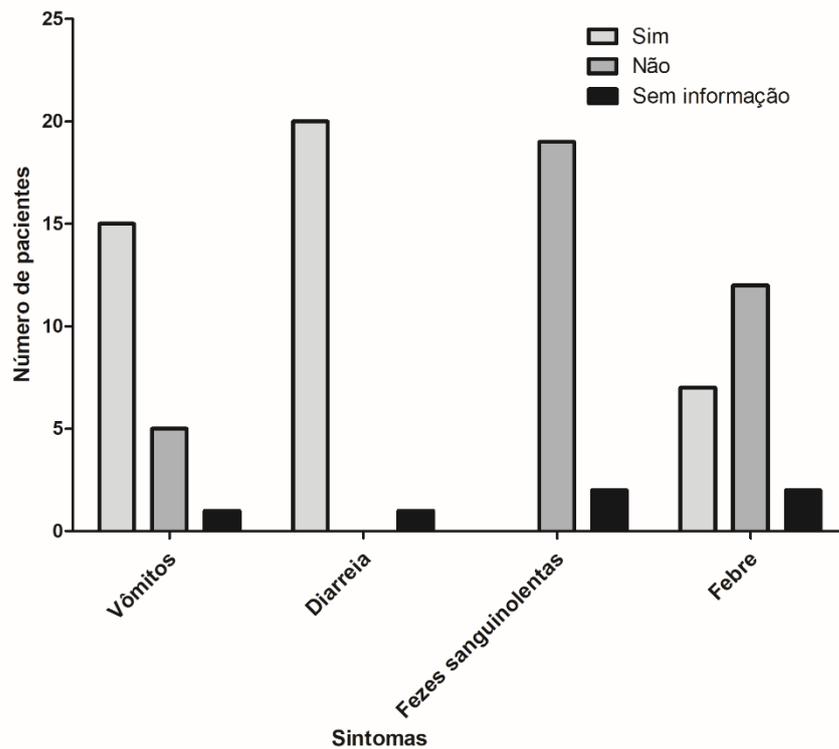
7.4.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes do estudo

Foram selecionadas 21 amostras de suspensão fecal para sequenciamento, coletadas nos anos de 2014 a 2017 e positivas para NoV. Os indivíduos selecionados tinham entre dois meses e dois anos de idade, com média de um ano. Nove pacientes (42,86%) eram do sexo feminino e 12 (57,14%) do sexo masculino. A maioria dos pacientes (85,71%; $n = 18$) foram provenientes de Recife, capital de PE. Outros municípios de residência dos pacientes foram Jaboatão dos Guararapes ($n = 1$), Altinho ($n = 1$) e Belém de São Francisco ($n = 1$).

Em relação à sintomatologia clínica dos pacientes, 15 (71,42%) tiveram episódios de vômitos, que duraram de um a três dias. Cinco pessoas (23,8%) não tiveram vômitos e um paciente não possuía essa informação em sua ficha epidemiológica. Todos tiveram episódios de diarreia, que duraram de um a três dias, com exceção de um paciente que não possuía essa

informação em sua ficha epidemiológica. A maioria dos pacientes (90,48%; $n = 19$) apresentou fezes não sanguinolentas e dois não possuíam essa informação em suas fichas. Sete (33,33%) tiveram febre, com temperatura média de 38,08°C, 12 (57,14%) não apresentaram e em dois casos não foi informado. Esses dados estão descritos na Figura 33.

Figura 33 – Características clínicas dos pacientes do estudo.

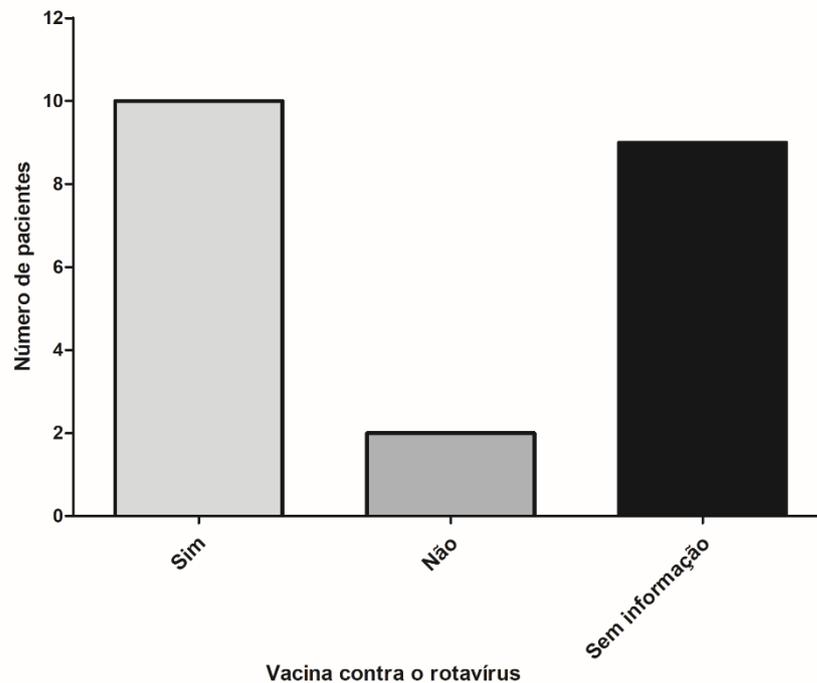


Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Sintomas apresentados pelos pacientes acometidos com NoV cujas amostras foram sequenciadas.

Dos pacientes analisados, 10 (47,62%) eram vacinados contra o rotavírus, nove (42,86%) não possuíam essa informação na ficha epidemiológica e apenas dois (9,52%) não eram vacinados. Essas informações podem ser visualizadas na Figura 34.

Dessas amostras, uma foi sequenciada por NGS e 20 pela metodologia tradicional de Sanger.

Figura 34 – Estado vacinal dos participantes do estudo.

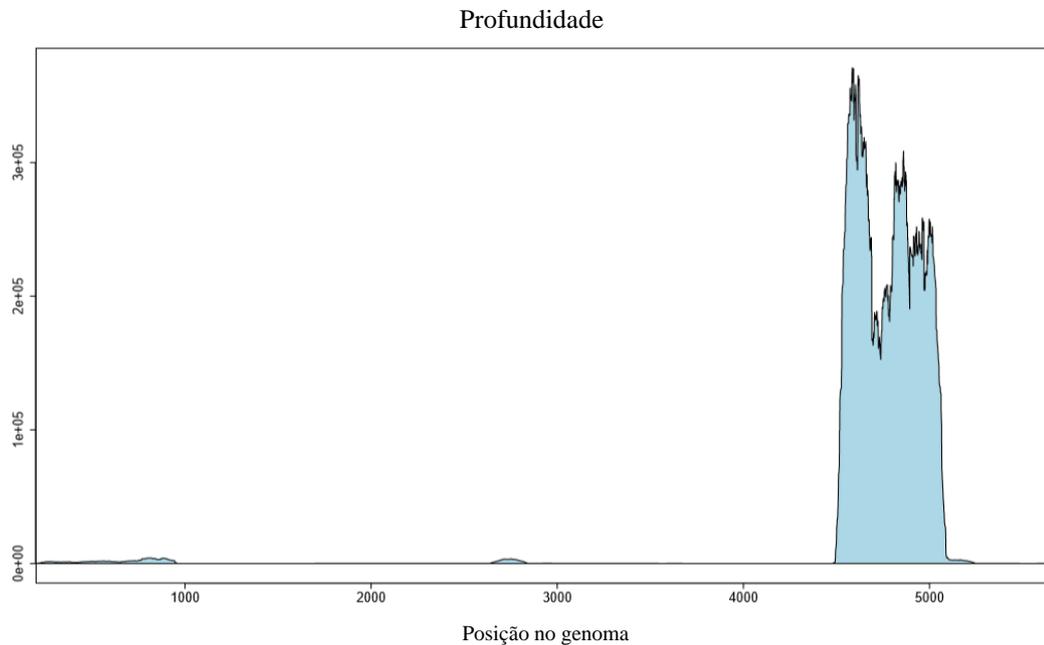
Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Estado vacinal contra o rotavírus dos pacientes cujas amostras foram sequenciadas.

7.4.2 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Uma das amostras de fezes selecionadas nesse estudo foi sequenciada pela metodologia de NGS. Foram utilizados *primers* inéditos, desenhados nesse estudo a partir do alinhamento de cepas do NoV GII, a fim de cobrir o genoma completo viral. Entretanto, apenas 48,93% (com cobertura $\geq 100x$) do genoma foi sequenciado (3781pb). Através da filogenia, foi possível caracterizar a referida cepa como GII.4.

Ficou evidenciado que, apesar de permitirem sequenciar e caracterizar filogeneticamente o vírus, nossos *primers* não conseguiram cobrir o genoma completo do NoV. A região mais conservada do genoma (junção ORF1-ORF2) teve uma cobertura extremamente maior que o restante (Figura 35). Assim, novos iniciadores devem ser desenhados e padronizados a fim de uma maior cobertura do genoma.

Figura 35 – Profundidade do NGS do genoma completo de NoV.

Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: Gráfico mostrando regiões com melhor cobertura no NGS de uma amostra de NoV GII.

7.4.3 Sequenciamento de Sanger

Frente à necessidade de futuras padronizações no NGS, optamos por realizar o sequenciamento convencional de Sanger para caracterizar molecularmente as cepas de NoV circulantes em PE.

Vinte amostras foram sequenciadas por essa metodologia, utilizando o par de *primers* 11F e 11R, que têm como alvo uma região de 786pb. As sequências consenso foram obtidas através do alinhamento e edição de cada sequência *foward*, *reverse* e uma cepa de NoV de referência (GenBank: KF712501.1 ou KF712504.1) no programa SeqMan, do pacote DNASTAR Lasergene (DNASTAR, WI, USA). As sequências obtidas variaram de 315 a 730pb.

A genotipagem do NoV foi realizada utilizando-se a ferramenta Norovirus Typing Tool Version 2.0 (KRONEMAN *et al.*, 2011). Baseando-se no gene da polimerase (RdRp) e da proteína do capsídeo VP1, as amostras foram classificadas e bi nomeadas de acordo com Kroneman *et al.* (2013).

Dentre as 20 amostras sequenciadas, quatro diferentes genótipos do genogrupo GII foram identificados circulando em PE: GII.Pe-GII.4, n=16; GII.P16-GII.4, n=2; GII.P16-GII.3, n=1; GII.P4-GII.4, n=1 (Quadro 4). Essas sequências estão disponíveis para a comunidade científica no GenBank com números de acesso de MN416493-MN416512.

Quadro 4 – Genótipos de NoV GII circulantes em PE.

Polimerase	Capsídeo	N (%)
GII.Pe	GII.4	16 (80)
GII.P16	GII.4*	2 (10)
GII.P16	GII.3	1 (5)
GII.P4**	GII.4	1 (5)
	Total	20 (100)

Fonte: elaborada pela autora.

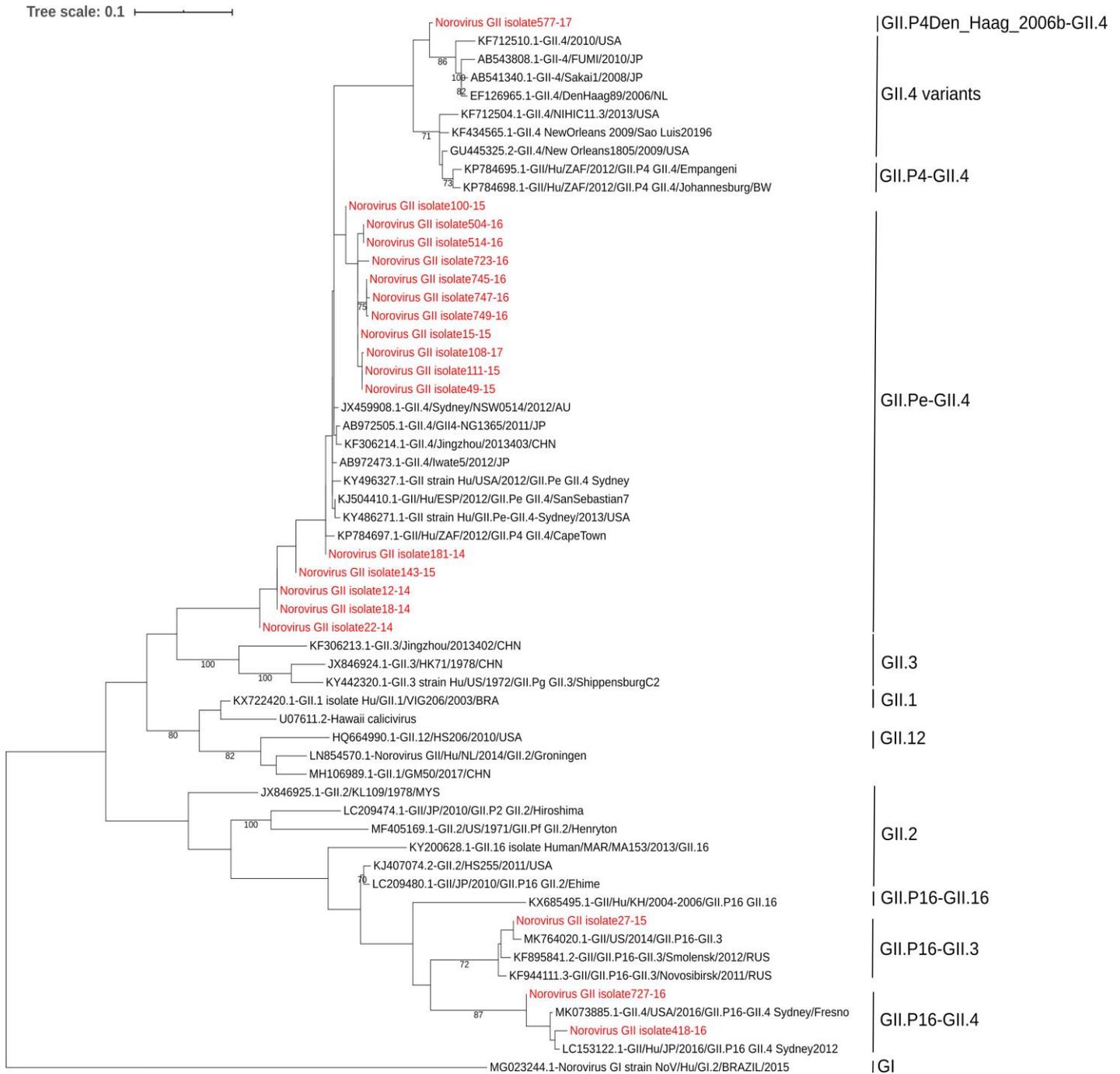
Notas: números de acesso de MN416493-MN416512.

*Sydney_2012

**Den_Haag_2006b

Na figura 36 podemos observar a árvore filogenética construída a partir do alinhamento dessas sequências com 37 diferentes sequências de vários genótipos do NoV GII.

Figura 36 – Árvore filogenética dos NoV circulantes em PE.



Fonte: elaborada pela autora.

Nota: O NoV GI foi utilizado como *outgroup* (número de acesso GenBank: MG023244). A árvore foi construída no MEGA X e editada no iTOL Tree. Os valores de *bootstrap* acima de 70% estão expostos.

Legenda: Árvore filogenética construída a partir do alinhamento múltiplo das 20 seqüências de NoV obtidas nesse estudo através do sequenciamento de Sanger (destaque em vermelho) e cepas de referência de NoV GII.

8 DISCUSSÃO

O norovírus é responsável por 18% das diarreias virais mundialmente (LOPMAN, 2015). Ainda existem lacunas a serem preenchidas sobre o NoV, sobretudo no Brasil. No país, embora ainda não exista um sistema de vigilância que investigue a prevalência desse vírus, sua importância vem sendo demonstrada em alguns Estados através de estudos epidemiológicos e moleculares. Esses estudos são essenciais para manutenção dessa vigilância epidemiológica e molecular do vírus no país, principalmente frente ao surgimento de novas variantes e substituição dos genótipos circulantes no Brasil e no mundo (DE ANDRADE *et al.*, 2014; PABBARAJU *et al.*, 2019).

Sabe-se que a RT-qPCR é uma técnica cada vez mais utilizada para a detecção do NoV, sendo uma alternativa muito atrativa frente à ausência de um sistema efetivo para isolamento viral (COTTON *et al.*, 2017; JOTHIKUMAR *et al.*, 2005; KAGEYAMA *et al.*, 2003; SCIPIONI; BOURGOT, *et al.*, 2008; SCIPIONI; MAUROY, *et al.*, 2008;). A PCR em tempo real é uma técnica rápida, sensível, prática e com menor riscos de contaminação para o diagnóstico do NoV. Isso permite que medidas de prevenção de disseminação do vírus sejam tomadas mais precocemente (GEORGIADIS *et al.*, 2010). Nesse estudo, padronizamos um novo protocolo de SYBR RT-qPCR para detecção e diagnóstico de NoV baseado em *primers* descritos anteriormente.

Apesar de ser uma alternativa mais barata, a sensibilidade e especificidade de SYBR Green® usualmente são mais baixas quando comparadas a TaqMan® e outras metodologias que usem sondas (ODREMAN-MACCHIOLI *et al.*, 2013). No nosso estudo, a sensibilidade da RT-qPCR para o genogrupo GI foi $4,85 \times 10^4$ cópias de RNA/ μ l e $4,79 \times 10^2$ cópias/ μ l para GII. Nossa técnica foi mais sensível que a descrita por Scipioni *et al.* (2008), que amplificou até o ponto de $5,6 \times 10^6$ cópias da curva de diluição. Resultados similares foram observados por Radin e D'souza (2011), entretanto usando alface, tomates cereja e cebolas verdes. Ainda em alimentos, outro estudo – dessa vez em moluscos – foi capaz de detectar 10^0 a 10^3 cópias/ μ l em amostras de cDNA, o que correspondeu a 10^2 a 10^5 cópias/g de tecido digestivo das ostras (OSHIKI *et al.*, 2018). Em relação à temperatura de *melting*, nossa PCR também corrobora com outros estudos descritos anteriormente, cujo valor foi em média 82°C para os dois genogrupos (GEORGIADIS *et al.*, 2010).

Moluscos bivalves são uma importante fonte de contaminação noroviral (HASSARD *et al.*, 2017). Cientistas ao redor do mundo inteiro pesquisam esse vírus em moluscos (BRAKE *et al.*, 2014; COSTANTINI *et al.*, 2006; JOTHIKUMAR *et al.*, 2005; LE MENNEC *et al.*, 2017;

OSHIKI *et al.*, 2018; RAZAFIMAHEFA *et al.*, 2019; SEO *et al.*, 2014). As taxas de detecção do NoV nesses diversos estudos são bem variáveis. Por exemplo, Torok *et al.* (2018) não detectaram o vírus em nenhuma das quase 300 amostras de ostra testadas, na Austrália. Por outro lado, Le Mennec *et al.* (2017) puderam detectar NoV GI e GII em 65% das 78 ostras analisadas na França. É difícil comparar os diferentes estudos existentes devido à variáveis como diferentes métodos de processamento e detecção, estabilidade viral e estação do ano (DEPAOLA *et al.*, 2010; TOROK *et al.*, 2018).

No Brasil, apenas poucos grupos de pesquisa buscaram detectar o NoV em moluscos. A taxa de detecção desses estudos variou de 0 a 85% (KELLER *et al.*, 2013; KELLER *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2018). Nosso estudo foi o primeiro do país a utilizar uma SYBR RT-qPCR para pesquisa do NoV em moluscos. Coletamos 380 moluscos (ostras e sururus) provenientes de Pernambuco e 1500 da Paraíba (ostras, sururus e mariscos), totalizando 1880 moluscos. Não conseguimos detectar o NoV GI nem NoV GII em nenhuma das amostras analisadas. Algumas vezes não é possível se obter sucesso na detecção do NoV (MORILLO *et al.*, 2012). Nossos resultados foram semelhantes aos descritos por Souza *et al.* (2018). Eles detectaram NoV GI em apenas duas amostras de *Anomalocardia brasiliiana*, outra espécie de molusco comumente consumida no Brasil, e nenhum NoV GII. Outro estudo apresentou uma taxa de detecção de NoV em ostras um pouco maior, 4,8% (n = 42), mas nenhuma em sururus (KELLER *et al.*, 2013). Souza *et al.* (2012) encontraram NoV GI em algumas ostras coletadas em dois pontos. Esses dados apresentados mostram que nosso estudo está de acordo com as referidas literaturas no Brasil.

É importante a análise de todos os fatores que possam estar envolvidos com a contaminação de moluscos por NoV, para melhorar os dados de vigilância epidemiológica. Esses dados detalhados podem ser úteis para estabelecimento do risco de contaminação e para a prevenção de doenças transmitidas por esses animais (CAMPOS; LEES, 2014). Os surtos de NoV em ostras envolvem a soma de diferentes fatores: baixa radiação solar, baixa temperatura da água, maré baixa, baixa salinidade, chuvas pesadas e ventos fortes (CHENAR; DENG, 2018). No nosso estudo, analisamos alguns desses fatores, que descrevemos a seguir.

Para determinar a variação sazonal da distribuição do NoV, visitamos os pontos de coleta em diferentes estações do ano (outono, inverno e verão). Porém, o Nordeste brasileiro é uma região quente na maior parte do ano, com elevada incidência solar e sem estações bem definidas. Obtivemos uma temperatura média do ambiente e da água de 30,37°C e 28,7°C, respectivamente. Campos *et al.* (2017) encontraram uma maior concentração viral em amostras de ostras coletadas em águas com temperaturas abaixo de 5°C do que as coletadas em

temperaturas acima de 10°C. Chenar e Deng (2018) predisseram que dois importantes fatores para redução do risco de contaminação por NoV são altas temperaturas e alta radiação solar. A alta radiação solar aumenta a incidência de raios UV e as temperaturas, promovendo inativação viral e reduzindo sua estabilidade. Além disso, os surtos de NoV são bem conhecidos por acontecerem nos meses frios e de inverno (CAMPOS *et al.*, 2013; DUIZER *et al.*, 2004; FANG *et al.*, 2019). As características climáticas observadas no Nordeste podem ter sido responsáveis pela ausência do NoV nos moluscos dessa região. O monitoramento das infecções por NoV é extremamente importante para prevenção de surtos entre os consumidores de moluscos, além de contribuir para melhoria do ambiente de estuários. Nosso estudo sugere que o risco de infecção por NoV através de ostras, sururus e mariscos consumidos durante o período de estudo, em PE e na PB, foi baixo. Esse dado é importante para o turismo gastronômico no litoral brasileiro e para a cadeia de produção desses invertebrados no NE. Estudos adicionais devem continuar sendo feitos na costa brasileira, para determinar a prevalência do NoV em moluscos bivalves e auxiliar no entendimento da sua eco epidemiologia em países tropicais.

Frente à ausência do vírus em amostras de moluscos, buscamos uma alternativa para estabelecimento do perfil molecular dos NoVs circulantes no Estado de PE. Para isso, decidimos avaliar as cepas virais presentes em amostras de fezes coletadas de humanos. Então foi desenvolvido um projeto em parceria com o LACEN/PE para obtenção de amostras sabidamente positivas para o NoV, a fim de que pudéssemos sequenciar o material genético do vírus presente nelas. Para isso, foram selecionadas 21 amostras, onde 20 foram sequenciadas por Sanger e 1 por NGS. Algumas características clínicas desses pacientes também foram analisadas.

Os pacientes selecionados tiveram idade variando de 2 meses a 2 anos, com média de 1 ano. Grande parte dos estudos realizados no Brasil mostra uma tendência maior à infecção por NoV em pacientes com menos de 5 anos (BITENCURT *et al.*, 2019; PAULA *et al.*, 2018; RABONI *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2017; VOLPINI *et al.*, 2019). Estudos desenvolvidos no mundo todo também relatam a importância da infecção por esse vírus em crianças (BIERHOFF *et al.*, 2018; FANG *et al.*, 2019; HARRIS *et al.*, 2019; HEBBELSTRUP JENSEN *et al.*, 2019; SHAH; HALL, 2018;).

Sabe-se que o NoV infecta indivíduos de todos os sexos, e que normalmente não observa-se diferença estatística entre eles, como descrito no estudo de Hebbelstrup Jensen *et al.* (2019). Raboni *et al.* (2014), em um estudo realizado no Brasil, não observaram nenhuma diferença entre os sexos dos pacientes analisados. Harris *et al.* (2019) descreveram um número de indivíduos do sexo feminino discretamente maior (52,83%), entretanto não houve diferença

estatisticamente significativa. No nosso estudo, 42,86% dos pacientes foram do sexo feminino e 57,14% do masculino.

A doença causada pelo NoV é conhecida como doença do vômito do inverno, do inglês “*winter vomit disease*”. Trata-se de uma patologia usualmente auto limitante, mas que pode ser bastante severa, sobretudo em países em desenvolvimento (SHAH; HALL, 2018). A diversidade genética dos NoVs pode ter importante influência na sintomatologia clínica dos pacientes e também na gravidade da doença. Entretanto, os principais sintomas observados nas infecções por NoV, além da diarreia, são febre, vômito e fezes não sanguinolentas (KU *et al.*, 2014; RABONI *et al.*, 2014).

No nosso estudo, 71,42% dos pacientes apresentaram episódios de vômitos, com duração de 1-3 dias, e 33,33% apresentaram febre baixa, com temperatura média de 38,08°C. 57,14% não apresentaram febre, concordando com Bierhoff *et al.* (2018), onde 56% dos indivíduos não relataram esse sintoma. Todos os pacientes apresentaram diarreia, também com duração de 1 a 3 dias. Em Harris *et al.* (2019), foi observado que 51,36% dos pacientes apresentaram diarreia e vômito, e foi detectado que a diarreia durou um pouco mais que o vômito (2,8 dias em comparação a 1,7 dias). Mesmo assim, nossos dados estão de acordo com o referido estudo. A diarreia com fezes não sanguinolentas também é característica da infecção por NoV. No nosso estudo, todos os pacientes que possuíam esse dado na sua ficha epidemiológica (90,48%) não tiveram fezes sanguinolentas.

A introdução da vacinação contra o rotavírus reduziu o número de casos e a mortalidade causados por esse vírus. Entretanto, permitiu ao NoV ganhar cada vez mais proeminência e impacto em todo o mundo (SANTOS *et al.*, 2017). Estudos desenvolvidos no Brasil têm relatado maior incidência do NoV do que do rotavírus, este que foi considerado por muitos anos a principal causa viral de gastroenterites agudas. Dessa maneira podemos observar claramente a ascensão do NoV (FERREIRA *et al.*, 2012; SIQUEIRA *et al.*, 2013). No nosso estudo, a maioria (47, 62%) dos pacientes que possuíam essa informação na ficha epidemiológica era vacinada contra o rotavírus. O perfil clínico e molecular de pacientes acometidos com norovirose em PE, no período de 2014 a 2017, foi publicado recentemente por nosso grupo, onde foi descrita a epidemiologia de todos os casos de infecção por NoV detectados nesse intervalo de tempo (GUARINES *et al.*, 2019).

O NoV é extremamente diverso geneticamente. O conhecimento das cepas circulantes no mundo é importante sobretudo para a comunidade científica, que busca constantemente novas técnicas diagnósticas e o desenvolvimento de antivirais e vacinas. Nesse estudo, foram caracterizamos molecularmente, através do sequenciamento de Sanger e do NGS, as cepas dos

21 pacientes com NoV provenientes do LACEN/PE no período de 2014-2017. O genótipo mais prevalente em nossa região foi o GII.Pe-GII.4 (16 casos). Esse genótipo também já foi descrito como mais detectado em outros países e no Brasil (BITENCURT *et al.*, 2019; CHUCHAONA *et al.*, 2019).

A classificação da genotipagem pela bi nomenclatura (*dual-typing nomenclature*) – levando em consideração o gene da polimerase/ORF1 e o gene do capsídeo viral/ORF2 – vem sendo proposta para melhor conhecer e identificar as cepas recombinantes de NoV. Em alguns estudos, a genotipagem é realizada utilizando-se apenas a região do capsídeo, dificultando a identificação das referidas cepas (HERNANDEZ *et al.*, 2018; KRONEMAN *et al.*, 2013). Para nomenclatura dos genótipos baseada na região da polimerase, o genogrupo vem seguido da letra “P” e uma identificação que pode ser numérica ou por letras, por exemplo, GII.P4. e GII.Pe. Já na classificação pela região do capsídeo, o genótipo vem indicado após o genogrupo apenas na forma de número, por exemplo GII.4.

No Brasil, o NoV GII.4 vem sendo o genótipo mais detectado há muito tempo, incluindo as variantes *New Orleans_2009* e *Sydney_2012* (HERNANDEZ *et al.*, 2018). Entretanto, o padrão da circulação de cepas recombinantes, a exemplo da GII.P16-GII.4 *Sydney*, vem mudando. Recombinações como essa vem sendo cada vez mais descritas. Em nosso estudo detectamos dois casos de NoV GII.P16-GII.4 *Sydney*. O genótipo da polimerase GII.P16 está crescentemente mais comum e várias recombinações estão sendo detectadas (BARCLAY *et al.*, 2019; BARREIRA *et al.*, 2017). Além de GII.Pe-GII.4 e GII.P16-GII.4, sequenciamos uma cepa do genótipo GII.P16-GII.3 e outra do GII.P4-GII.4 (*Den_Haag_2006*). Essa variação destaca a importância do monitoramento molecular e caracterização de cepas circulantes de NoV, ao demonstrar que a distribuição de novas cepas recombinantes está se tornando comum em grandes proporções.

A epidemiologia molecular e os estudos de vigilância da diversidade genética dos NoV devem continuar e aumentar cada vez mais para monitorar a emergência e prevalência de novas cepas e estabelecer os padrões de transmissão (CHUCHAONA *et al.*, 2019; PABBARAJU *et al.*, 2019). No Brasil, principalmente no Nordeste (NE), poucos estudos foram realizados para detectar e caracterizar molecularmente o NoV, tanto em amostras de moluscos bivalves quanto de humanos. Esses estudos são de extrema importância, por necessidade da população e do meio ambiente (PAULA *et al.*, 2018; PRATTE-SANTOS *et al.*, 2019). Sobretudo em PE e na PB, há uma lacuna desses estudos. Esse foi o primeiro trabalho a pesquisar a presença de NoV em bivalves nesses Estados, além de também ser o primeiro a estabelecer dados clínicos dos pacientes e as suas cepas circulantes em PE por um período de 4 anos.

Em nosso estudo, foi possível estabelecer uma linha de pesquisa inédita em PE e PB, com destaque para o desenvolvimento de uma plataforma diagnóstica e de sequenciamento no IAM/FIOCRUZ-PE. Esperamos poder auxiliar o governo e os profissionais de saúde no melhor manejo clínico da doença causada por NoV, com maior entendimento dos seus sintomas e da população afetada. Nossos dados também são importantes para a comunidade científica, especialmente no Brasil, onde pudemos provar que o vírus continua circulando e sofrendo alterações genéticas que permitem sua manutenção na população.

9 CONCLUSÕES

- a) Uma nova técnica diagnóstica foi padronizada para a detecção de NoV genogrupos GI e GII, além do sequenciamento de Sanger e NGS para o genogrupo GII;
- b) Os moluscos bivalves analisados no período desse estudo não apresentaram risco de contaminação por NoV para a população;
- c) A infecção por NoV em humanos apresenta características clínicas bem descritas, com diarreia e vômito sendo os sintomas mais comuns;
- d) Quatro diferentes genótipos (GII.Pe-GII.4, GII.P16-GII.4, GII.P16-GII.3 e GII.P4-GII.4) desse vírus foram sequenciados a partir de amostras de fezes de humanos infectados, e essas sequências foram disponibilizadas à comunidade científica;
- e) Altas taxas de recombinação e a existência de diferentes genótipos circulantes em uma mesma região comprovam a grande diversidade genética do NoV;
- f) Foi desenvolvida uma linha de pesquisa inédita em PE, com possibilidade de futuras parcerias, sobretudo com a Secretaria de Saúde do Estado para monitoramento contínuo da distribuição viral nessa região.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE – CPRH. Balneabilidade. **CPRH**, Recife, 2018. Disponível em: http://www.cprh.pe.gov.br/Controle_Ambiental/monitoramento/qualidade_da_agua/balneabilidade/41786%3B59066%3B48030101%3B0%3B0.asp. Acesso em: 11 jan. 2018.
- ALFANO-SOBSEY, E. *et al.* Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 140, n. 2, p. 276-82, Fev. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21524343>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- ALMAND, E. A.; MOORE, M. D.; JAYKUS, L. A. Norovirus Binding to Ligands Beyond Histo-Blood Group Antigens. **Front. Microbiol.**, Lausanne, v. 8, p. 2549, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29312233>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- AN, L. *et al.* Gangliosides are ligands for human noroviruses. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 136, n. 36, p. 12631-7, 10 Set. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25105447>. Acesso em: 11 fev. 2019.
- AZIM, K. F. *et al.* Immunoinformatics approaches for designing a novel multi epitope peptide vaccine against human norovirus (Norwalk virus). **Infect. Genet. Evol.**, Amsterdam, v. 74, p. 103936, 21 Jun. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31233780>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- BALDRIDGE, M. T.; TURULA, H.; WOBUS, C. E. Norovirus Regulation by Host and Microbe. **Trends. Mol. Med.**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 1047-1059, Dec. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27887808>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- BARCLAY, L. *et al.* Emerging Novel GII.P16 Noroviruses Associated with Multiple Capsid Genotypes. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 6, 8 Jun. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31181749>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- BARREIRA, D. *et al.* Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 12, p. e0189504, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29236779>. Acesso em: 4 abr. 2016.
- BARTNICKI, E. *et al.* Recent advances in understanding noroviruses. **F1000Res**, London, v. 6, p. 79, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28163914>. Acesso em: 4 abr. 2016.
- BIERHOFF, M. *et al.* Incidence and Clinical Profile of Norovirus Disease in Guatemala, 2008-2013. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 67, n. 3, p. 430-436, 18 Jul. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29420688>. Acesso em 4 abr. 2016.
- BITENCURT, E. L. R. *et al.* Epidemiological and molecular investigation of norovirus and astrovirus infections in Rio Branco, Acre, Northern Brazil: A retrospective study. **J. Med.**

Virol., New York, 9 Jan. 2019. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30624790>. Acesso em 4 abr. 2016.

BRAKE, F. *et al.* A survey of Australian oysters for the presence of human noroviruses.

Food. Microbiol., London, v. 44, p. 264-70, Dez. 2014. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25084672>. Acesso em 4 abr. 2016.

BRUGGINK, L. D.; MOSELEN, J. M.; MARSHALL, J. A. The molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Victoria, 2014 to 2015. **Commun. Dis. Intell. Q. Rep.**, Canberra, v. 41, n. 1, p. E21-E32, 31 Mar 2017. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28385136>. Acesso em 3 jun. 2016.

CAMPOS, C. J.; LEES, D. N. Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 80, n. 12, p. 3552-61, Jun. 2014.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24705321>. Acesso em 3 jun. 2016.

CAMPOS, C. J. A. *et al.* Levels of Norovirus and E. coli in Untreated, Biologically Treated and UV-Disinfected Sewage Effluent Discharged to a Shellfish Water. **J. Water. Resour. Prot.**, Herndon, v. 5, p. 978-982, 28 Set. 2013.

CAMPOS, C. J. A. *et al.* Risk factors for norovirus contamination of shellfish water

catchments in England and Wales. **Int. J. Food. Microbiol.**, Amsterdam, v. 241, p. 318-324, 16 Jan. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27837721>. Acesso em 3 jun. 2016.

CAMPOS, G. S. *et al.* Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. **Arch. Virol.**, Wien, v. 153, n. 6, p. 1125-9, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18392770>. Acesso em 3 jun. 2016.

CARDEMIL, C. V.; PARASHAR, U. D.; HALL, A. J. Norovirus Infection in Older Adults: Epidemiology, Risk Factors, and Opportunities for Prevention and Control. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v. 31, n. 4, p. 839-870, Dez 2017. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28911830>. Acesso em 3 jun. 2016.

CAVALVANTI, M. P.; DE LORENA, V. M. B.; GOMES, Y. M. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Rev. Patol. Trop.**, Goiania, v. 37, n. 1, p. 14, Jan.-Abr. 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **About Norovirus 2016.**

Disponível em: <https://www.cdc.gov/norovirus/about/index.html>. Acesso em: 2 Jan. 18.

CHAN, M. C. W. *et al.* Global Spread of Norovirus GII.17 Kawasaki 308, 2014-2016.

Emerg. Infect. Dis., Atlanta, v. 23, n. 8, p. 1359-1354, Ago. 2017. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28726618>. Acesso em: 15 mai. 2016.

CHENAR, S. S.; DENG, Z. Development of genetic programming-based model for predicting oyster norovirus outbreak risks. **Water. Res.**, Oxford, v. 128, p. 20-37, 1 Jan. 2018.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29078068>. Acesso em: 15 mai. 2016.

CHHABRA, P. *et al.* Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. **J Gen Virol**, London, 4 Set. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31483239>. Acesso em: 15 mai. 2016.

CHUCHAONA, W. *et al.* Recombinant GII.Pe-GII.4 Norovirus, Thailand, 2017-2018. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 25, n. 8, p. 1612-1614, Ago. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31310212>. Acesso em: 15 mai. 2016.

CORTES-PENFIELD, N. W. *et al.* Prospects and Challenges in the Development of a Norovirus Vaccine. **Clin. Ther.**, Princeton, v. 39, n. 8, p. 1537-1549, Ago. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28756066>. Acesso em: 15 mai. 2016.

COSTANTINI, V. *et al.* Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 72, n. 3, p. 1800-9, Mar. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517625>. Acesso em: 15 mai. 2016.

COTTON, B. T. *et al.* The Norovirus NS3 Protein Is a Dynamic Lipid- and Microtubule-Associated Protein Involved in Viral RNA Replication. **J. Virol.**, Washington, v. 91, n. 3, 1 Fev. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27881660>. Acesso em: 15 mai. 2016.

DE ANDRADE, J. S. R. *et al.* Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 61, n. 3, p. 345-52, Nov. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25223919>. Acesso em 3 jun. 2016.

DE GRAAF, M. *et al.* Emergence of a novel GII.17 norovirus - End of the GII.4 era? **Euro. Surveill.**, Saint-Maurice, v. 20, n. 26, 2 Jul. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26159308>. Acesso em 3 jun. 2016.

DEPAOLA, A. *et al.* Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 76, n. 9, p. 2754-68, Mai. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190085>. Acesso em 3 jun. 2016.

DUIZER, E. *et al.* Inactivation of caliciviruses. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4538-43, Ago. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15294783>. Acesso em 3 jun. 2016.

DYCKE, J. V. *et al.* A robust human norovirus replication model in zebrafish larvae. **BioRxiv**, New York, v. 528364, p. 16, 23 jan. 2019.

ELBASHIR, S. *et al.* Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review. **Food. Microbiol.**, London, v. 70, p. 85-93, Abr. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29173644>. Acesso em 3 jun. 2016.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 4, 15 Fev. 1971.

ESTES, M. K. *et al.* Human Norovirus Cultivation in Nontransformed Stem Cell-Derived Human Intestinal Enteroid Cultures: Success and Challenges. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 638, p. 1-12, 11 Jul. 2019.

ETTAYEBI, K. *et al.* Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. **Science**, New York, v. 353, n. 6306, p. 1387-1393, 23 Set. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27562956>. Acesso em: 3 jan. 2019.

FANG, Y. L. *et al.* Molecular epidemiology of norovirus in children with acute gastroenteritis in Tianjin, China. **Zhongguo. Dang. Dai. Er. Ke. Za. Zhi.**, Changsha, v. 21, n. 2, p. 139-143, Fev. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30782275>. Acesso em: 11 fev. 2019.

FERRADOR, T. Diferenças entre rotavírus e norovírus. **Guia Farm.**, São Paulo, 2016. Disponível em: <https://guiadafarmacia.com.br/materia/diferencas-entre-rotavirus-e-norovirus/>. Acesso em: 11 Jul. 2019.

FERREIRA, M. S. *et al.* Surveillance of norovirus infections in the state of Rio De Janeiro, Brazil 2005-2008. **J. Med. Virol.**, New York, v. 82, n. 8, p. 1442-8, Ago. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20572088>. Acesso em: 11 fev. 2019.

FERREIRA, M. S. *et al.* Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e33754, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22448271>. Acesso em: 11 fev. 2019.

FERREIRA, M. S. *et al.* Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. **J. Med. Virol.**, New York, v. 80, n. 2, p. 338-44, Fev. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18098155>. Acesso em: 11 fev. 2019.

FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. Sequenciando Gemonas *In*: GENÉTICA, S. B. D. (ed.). **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto: Editora Cubo, 2015. cap. 2, p.27-64.

FIORETTI, J. M. *et al.* Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e92988, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24667283>. Acesso em: 11 fev. 2019.

FISCHER, T. K.; RASMUSSEN, L. D.; FONAGER, J. Taking gastro-surveillance into the 21st century. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 117, p. 43-48, 31 Mai. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31176211>. Acesso em: 11 jul. 2019.

GARCIA, L. A.; NASCIMENTO, M. A.; BARARDI, C. R. Effect of UV light on the inactivation of recombinant human adenovirus and murine norovirus seeded in seawater in shellfish depuration tanks. **Food Environ. Virol.**, New York, v. 7, n. 1, p. 67-75, Mar. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25528135>. Acesso em: 11 fev. 2019.

GARRIDO-CARDENAS, J. A. *et al.* DNA Sequencing Sensors: An Overview. **Sensors (Basel)**, Basel, v. 17, n. 3, 14 Mar. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28335417>. Acesso em: 11 fev. 2019.

GAYTHORPE, K. A. M. *et al.* Norovirus transmission dynamics: a modelling review. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, p. 1-12, 22 Dez. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29268812>. Acesso em: 11 fev. 2019.

GENOMICTREE. Real-time PCR. **Genomic Tree**, Seoul, 2019. Disponível em: <http://genomictree.com/zh/microarray-ngs-service-2/pcr-service/real-time-pcr/?ckattempt=1>. Acesso em: 21 jul. 2019.

GEORGIADIS, S. *et al.* Avaliação molecular de norovírus em pacientes com gastroenterite aguda. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 3, p. 4, 06 Abr. 2010.

GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D.; ESTES, M. K. Norovirus gastroenteritis. **N Engl J Med**, Boston, v. 361, n. 18, p. 1776-85, 29 out. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19864676>. Acesso em: 11 fev. 2019.

GRADA, A.; WEINBRECHT, K. Next-generation sequencing: methodology and application. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v. 133, n. 8, p. e11, Ago. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856935>. Acesso em: 11 fev. 2019.

GRAZIANO, V. R.; WEI, J.; WILEN, C. B. Norovirus Attachment and Entry. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 6, 30 Mai. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31151248>. Acesso em: 11 jul. 2019.

GREEN, K. Y. *Caliciviridae: The Noroviruses*. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (ed.). **Fields Virology**. 6th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. cap. 20, p.582-608. ISBN 1-4511-0563-0.

GUARINES, K. M. *et al.* Norovirus-associated gastroenteritis, Pernambuco, Northeast Brazil, 2014-2017. **J. Med. Virol.**, New York, 19 Nov. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31743458>. Acesso em: 19 nov. 2019.

GUIX, S. *et al.* Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. **J. Virol.**, Washington, v. 81, n. 22, p. 12238-48, Nov. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17855551>. Acesso em: 11 fev. 2019.

HAMER, D. H. Multiplex PCR for determining aetiology of travellers' diarrhoea: too much information or too little? **J. Travel Med.**, Oxford, v. 25, n. 1, 1 Jan. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29394386>. Acesso em: 11 fev. 2019.

HARRIS, J. P. *et al.* Norovirus strain types found within the second infectious intestinal diseases (IID2) study an analysis of norovirus circulating in the community. **BMC Infect. Dis.**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 87, 25 Jan. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30683063>. Acesso em: 10 out. 2019.

HASSARD, F. *et al.* Critical Review on the Public Health Impact of Norovirus Contamination in Shellfish and the Environment: A UK Perspective. **Food Environ. Virol.**, New York, v. 9, n. 2, p. 123-141, Jun. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28176295>. Acesso em: 10 out. 2019.

- HEBBELSTRUP JENSEN, B. *et al.* Children Attending Day Care Centers are a Year-round Reservoir of Gastrointestinal Viruses. **Sci. Rep.**, London, v. 9, n. 1, p. 3286, 1 Mar. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30824842>. Acesso em: 10 out. 2019.
- HEGGELUND, J. E. *et al.* Histo-blood group antigens as mediators of infections. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, London, v. 44, p. 190-200, Jun. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28544984>. Acesso em: 10 out. 2019.
- HERNANDEZ, J. M. *et al.* Molecular epidemiology and temporal evolution of norovirus associated with acute gastroenteritis in Amazonas state, Brazil. **BMC Infect. Dis.**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 147, 2 Abr. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29606095>. Acesso em: 10 out. 2019.
- INNS, T. *et al.* Community-based surveillance of norovirus disease: a systematic review. **BMC Infect. Dis.**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 657, 29 Set. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28962598>. Acesso em: 10 out. 2019.
- JIANG, X. *et al.* Sequence and genomic organization of Norwalk virus. **Virology**, New York, v. 195, n. 1, p. 51-61, Jul. 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8391187>. Acesso em: 10 abr. 2016.
- JONES, M. K. *et al.* Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. **Science**, New York, v. 346, n. 6210, p. 755-9, 7 Nov. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25378626>. Acesso em: 10 out. 2019.
- JOTHIKUMAR, N. *et al.* Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 71, n. 4, p. 1870-5, Abr. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15812014>. Acesso em: 10 abr. 2016.
- KAGEYAMA, T. *et al.* Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 41, n. 4, p. 1548-57, Abr. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682144>. Acesso em: 10 abr. 2016.
- KAPIKIAN, A. Z. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 181, Suppl. 2, p. S295-302, Mai. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10804141>. Acesso em: 10 abr. 2016.
- KAPIKIAN, A. Z. *et al.* Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **J. Virol.**, Washington, v. 10, n. 5, p. 1075-81, Nov. 1972. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4117963>. Acesso em: 10 abr. 2016.
- KARST, S. M. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. **Viruses**, Basel, v. 2, n. 3, p. 748-81, Mar. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994656>. Acesso em: 10 abr. 2016.
- KELLER, R.; JUSTINO, J. F.; CASSINI, S. T. Assessment of water and seafood microbiology quality in a mangrove region in Vitoria, Brazil. **J. Water Health**, London, v.

11, n. 3, p. 573-80, Set. 2013. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23981884>. Acesso em: 10 abr. 2016.

KELLER, R. *et al.* Surveillance of Enteric Viruses and Thermotolerant Coliforms in Surface Water and Bivalves from a Mangrove Estuary in Southeastern Brazil. **Food Environ. Virol.**, New York, 1 Jun. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31154653>. Acesso em: 13 out. 2019.

KRONEMAN, A. *et al.* Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. **Arch Virol**, New York, v. 158, n. 10, p. 2059-68, Out. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23615870>. Acesso em: 13 out. 2019.

KRONEMAN, A. *et al.* An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 121-5, Jun. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21514213>. Acesso em: 13 out. 2019.

KU, M. S. *et al.* Clinical characteristics and outcome in norovirus gastroenteritis. **Indian J. Pediatr.**, Mumbai, v. 81, n. 12, p. 1321-6, Dez. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24705943>. Acesso em: 13 out. 2019.

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Mol. Aspects Med.**, Oxford, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, Abr.-Junb 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460794>. Acesso em: 13 out. 2019.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol. Biol. Evol.**, New York, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 1 Jun. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29722887>. Acesso em: 13 out. 2019.

LANGMEAD *et al.* Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. **Bioinformatics**, Oxford, v. 35, n.1, p. 421-432, 18 Jul. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6361242>. Acesso em: 29 mar. 2020.

LANGMEAD B; SALZBERG SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nat. Methods**, New York, v. 9, n. 4, p.357-9, 4 Mar. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3322381>. Acesso em: 29 mar. 2020.

LAVANDER, H. D. *et al.* O desenvolvimento da ostreicultura em Pernambuco. **Bol. Tec. Cient.**, Tamandaré, v. 15, n. 2, p. 8, 2007.

LE MENNEC, C. *et al.* Follow-Up of Norovirus Contamination in an Oyster Production Area Linked to Repeated Outbreaks. **Food Environ. Virol.**, New York, v. 9, n. 1, p. 54-61, Mar. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27613529>. Acesso em: 13 out. 2019.

LEITE, C. Bactérias predominam em surtos de diarreia em PE; veja o que se sabe até agora. **JC Online**, Recife, 2017. Disponível em: <http://jconline.ne10.uol.com.br/canal/cidades/saude/noticia/2017/06/28/bacterias-predominam-em-surtos-de-diarreia-em-pe-veja-o-que-se-sabe-ate-agora-292132.php>. Acesso em: 5 jan. 2018.

- LI, T. F. *et al.* Human Norovirus NS3 has RNA Helicase and Chaperoning Activities. **J. Virol.**, Washington, 13 Dez. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29237842>. Acesso em: 13 out. 2019.
- LINDESMITH, L. C. *et al.* Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. **PLoS Med.**, San Francisco, v. 5, n. 2, p. e31, Fev. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18271619>. Acesso em: 13 out. 2019.
- LINDESMITH, L. C. *et al.* Sera Antibody Repertoire Analyses Reveal Mechanisms of Broad and Pandemic Strain Neutralizing Responses after Human Norovirus Vaccination. **Immunity**, Cambridge, v. 50, n. 6, p. 1530-1541 e8, 18 Jun. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31216462>. Acesso em: 13 out. 2019.
- LOPMAN, B. **Global Burden of Norovirus and Prospects for Vaccine Development**. Atlanta: CDC Foundation, 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/norovirus/downloads/global-burden-report.pdf>. Acesso em: 2 Jan 2018.
- MALLAGARAY, A. *et al.* A post-translational modification of human Norovirus capsid protein attenuates glycan binding. **Nat. Commun.**, London, v. 10, n. 1, p. 1320, 21 Mar. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30899001>. Acesso em: 13 out. 2019.
- MARSH, Z. A. *et al.* The unwelcome houseguest: secondary household transmission of norovirus. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, p. 1-9, 12 Dez. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29229009>. Acesso em: 13 out. 2019.
- MATHIJS, E. *et al.* A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses. **Food Environ. Virol.**, New York, v. 4, n. 4, p. 131-52, Dez. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23412887>. Acesso em: 13 out. 2019.
- MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 74, n. 2, p. 560-4, Fev. 1977. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/265521>. Acesso em: 13 out. 2019.
- MENEGUESSI, G. M. *et al.* Morbimortalidade por doenças diarreicas agudas em crianças menores de 10 anos no Distrito Federal, Brasil, 2003 a 2012. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 10, out.-dez. 2015.
- MERUSSI, G. D.; MAFFEI, D. F.; CATANOZI, M. P. L. M. Surtos de gastroenterite relacionados ao consumo de laticínios no Estado de São Paulo no período de 2000 a 2010. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 23, n. 4, p. 7, Dez. 2012.
- MOORE, M. D.; GOULTER, R. M.; JAYKUS, L. A. Human norovirus as a foodborne pathogen: challenges and developments. **Annu. Rev. Food. Sci. Technol.**, Palo Alto, v. 6, p. 411-33, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25884284>. Acesso em: 13 out. 2019.
- MORILLO, S. G. *et al.* Rapid detection of norovirus in naturally contaminated food: foodborne gastroenteritis outbreak on a cruise ship in Brazil, 2010. **Food Environ. Virol.**,

New York, v. 4, n. 3, p. 124-9, Set. 2012. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23412839>. Acesso em: 13 out. 2019.

MORILLO, S. G.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Norovirus: an overview. **Rev. Assoc. Med. Bras.** (1992), São Paulo, v. 57, n. 4, p. 453-8, Jul.-Ago. 2011. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21876931>. Acesso em: 13 out. 2019.

MOTOYA, T. *et al.* Molecular Evolution of the VP1 Gene in Human Norovirus GII.4 Variants in 1974-2015. **Front Microbiol**, Lausanne, v. 8, p. 2399, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29259596>. Acesso em: 13 out. 2019.

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

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18317870>. Acesso em: 13 out. 2019.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Ver. Bras. Med.**, Rio de Janeiro, v. 67, p. 13, 10 Nov. 2010.

NISHIDA, A. K.; NIVALDO, N.; ALVES, R. R. N. Aspectos socioeconômicos dos catadores de moluscos do litoral paraibano, Nordeste do Brasil. **Rev. Bio. Cie. Terra**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 9, 2008.

NOVAIS, C. M.; ALVES-PIRES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. **Rev. Biotec., Cie. Des.**, Brasília, v. 33, p. 4, 2004.

O'RYAN, M.; RIERA-MONTES, M.; LOPMAN, B. Norovirus in Latin America: Systematic Review and Meta-analysis. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, Baltimore, v. 36, n. 2, p. 127-134, Fev. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27755462>. Acesso: 4 jan. 2019.

ODREMAN-MACCHIOLI, M. *et al.* Analysis of real time PCR amplification efficiencies from three genomic region of dengue virus. **Invest. Clin.**, Maracaibo, v. 54, n. 1, p. 5-19, Mar. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23781709>. Acesso: 4 jan. 2019.

OSHIKI, M. *et al.* Microfluidic PCR Amplification and MiSeq Amplicon Sequencing Techniques for High-Throughput Detection and Genotyping of Human Pathogenic RNA Viruses in Human Feces, Sewage, and Oysters. **Front Microbiol**, Lausanne, v. 9, p. 830, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29755444>. Acesso: 4 jan. 2019.

PABBARAJU, K. *et al.* Emergence of a Novel Recombinant Norovirus GII.P16-GII.12 Strain Causing Gastroenteritis, Alberta, Canada. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 25, n. 8, p. 1556-1559, Ago. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31310222>. Acesso: 3 set. 2019.

PATEL, M. M. *et al.* Noroviruses: a comprehensive review. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 1-8, Jan. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19084472>. Acesso: 3 set. 2019.

PAULA, F. L. *et al.* Acute Gastroenteritis Associated with Norovirus Gii.4 Variants. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 264-266, Jul.-Set. 2018.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30540089>. Acesso: 3 set. 2019.

PERRY, J. Normal upper extremity kinesiology. **Phys. Ther.**, Alexandria, v. 58, n. 3, p. 265-78, Mar. 1978. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/628678>. Acesso: 3 set. 2019.

PRATTE-SANTOS, R. *et al.* High prevalence of enteric viruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in a low-income area in Vitoria, Southeastern Brazil. **J. Med. Virol.**, New York, 4 Jan. 2019. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30614007>. Acesso: 3 set. 2019.

QU, L. *et al.* Replication of Human Norovirus RNA in Mammalian Cells Reveals Lack of Interferon Response. **J. Virol.**, Washington, v. 90, n. 19, p. 8906-23, 1 Out. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27466422>. Acesso: 3 set. 2019.

RABONI, S. M. *et al.* Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 4, p. 428-35, Jul. 2014. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075782>. Acesso: 3 set. 2019.

RADIN, D.; D'SOUZA, D. H. Simple and Rapid Detection of Human Norovirus from Produce Using SYBR Green I-based Real-time RT-PCR. **Food Environ. Virol.**, New York, v. 3, p. 121, 23 Ago. 2011. Disponível em:

<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs12560-011-9066-5.pdf> . Acesso: 3 set. 2019.

RANDAZZO, W.; D'SOUZA, D. H.; SANCHEZ, G. Norovirus: The Burden of the Unknown. **Adv. Food Nutr. Res.**, San Diego, v. 86, p. 13-53, 2018. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30077220>. Acesso: 3 set. 2019.

RAZAFIMAHEFA, R. M.; LUDWIG-BEGALL, L. F.; THIRY, E. Cockles and mussels, alive, alive, oh-The role of bivalve molluscs as transmission vehicles for human norovirus infections. **Transbound Emerg. Dis.**, Berlin, 24 Jun. 2019. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31232515>. Acesso: 3 set. 2019.

RIBEIRO, L. R. *et al.* Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 2, p.

201-6, Mar. 2008. Disponível em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425274>. Acesso: 3 set. 2019.

RIERA-MONTES, M.; O'RYAN, M.; VERSTRAETEN, T. Norovirus and Rotavirus disease severity in children: Systematic Review and Meta-Analysis. **Pediatr. Infect. Dis. J.**,

Baltimore, 11 Nov. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29135827>. Acesso: 3 set. 2019.

ROBILOTTI, E.; DERESINSKI, S.; PINSKY, B. A. Norovirus. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 28, n. 1, p. 134-64, Jan. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25567225>. Acesso: 3 set. 2019.

ROBINSON *et al.* Variant Review with the Integrative Genomics Viewer (IGV). **Cancer Res.**, Chicago, v. 77, n. 21, p. 31-34, 1 nov. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5678989>. Acesso em: 29 mar. 2020.

RUPPROM, K. *et al.* Evaluation of real-time RT-PCR assays for detection and quantification of norovirus genogroups I and II. **Viol. Sin.**, Beijing, v. 32, n. 2, p. 139-146, Abr. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28224385>. Acesso em 5 nov. 2016.

SANGER, F. *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, London, v. 265, n. 5596, p. 687-95, 24 Fev. 1977. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/870828>. Acesso em 5 nov. 2016.

SANTOS, V. S. *et al.* Acute norovirus gastroenteritis in children in a highly rotavirus-vaccinated population in Northeast Brazil. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 88, p. 33-38, Mar. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28160726>. Acesso em 5 nov. 2016.

SATO, S. *et al.* Human Norovirus Propagation in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells. **Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.**, Philadelphia, v. 7, n. 3, p. 686-688 e5, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30543870>. Acesso em 5 nov. 2016.

SCIPIONI, A. *et al.* Detection and quantification of human and bovine noroviruses by a TaqMan RT-PCR assay with a control for inhibition. **Mol. Cell Probes**, London, v. 22, n. 4, p. 215-22, Ago. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18424068>. Acesso em 5 nov. 2016.

SCIPIONI, A. *et al.* A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition. **Virol. J.**, London, v. 5, p. 94, 14 Ago. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18702817>. Acesso em 5 nov. 2016.

SEO, D. J. *et al.* Seasonal and regional prevalence of norovirus, hepatitis A virus, hepatitis E virus, and rotavirus in shellfish harvested from South Korea. **Food Control**, Cambridge, v. 41, p. 178-184, 14 Jan. 2014.

SHAH, M. P.; HALL, A. J. Norovirus Illnesses in Children and Adolescents. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 32, n. 1, p. 103-118, Mar. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29406972>. Acesso em 5 nov. 2016.

SIQUEIRA, J. A. *et al.* Group A rotavirus and norovirus display sharply distinct seasonal profiles in Belem, northern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 5, p. 661-4, Ago. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23903985>. Acesso em 5 nov. 2016.

SMERTINA, E. *et al.* Calicivirus RNA-Dependent RNA Polymerases: Evolution, Structure, Protein Dynamics, and Function. **Front. Microbiol.**, Lausanne, v. 10, p. 1280, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31244803>. Acesso em 5 nov. 2016.

SOKEL, S.; KALE, M. Investigação de genogrupos de norovírus (GI, GII e GIV) nas fezes de cães de estimação com diarreia. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 6, p. 7, Jun. 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2019000600402&lng=en&nrm=iso. Acesso em 5 nov. 2016.

SOUZA, D. S. *et al.* Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 153-61, Fev. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22036209>. Acesso em 5 nov. 2016.

SOUZA, D. S. M. *et al.* Presence of enteric viruses, bioaccumulation and stability in *Anomalocardia brasiliana* clams (Gmelin, 1791). **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 266, p. 363-371, 2 Fev. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29074195>. Acesso em 5 nov. 2016.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Mol. Biol. Evol.**, New York, v. 10, n. 3, p. 512-26, Mai. 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8336541>. Acesso em: 8 dez. 2017.

THORNE, L. G.; GOODFELLOW, I. G. Norovirus gene expression and replication. **J. Gen. Virol.**, London, v. 95, n. Pt 2, p. 278-91, Fev. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24243731>. Acesso em: 8 dez. 2017.

THORNHILL, T. S. *et al.* Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. **J. Infect. Dis.**, Oxford, v. 135, n. 1, p. 20-7, Jan. 1977. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/401851>. Acesso em: 8 dez. 2017.

TOROK, V. *et al.* National survey of foodborne viruses in Australian oysters at production. **Food Microbiol.**, London, v. 69, p. 196-203, Fev. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28941902>. Acesso em: 8 dez. 2018.

VIEIRA, C. B. *et al.* Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 6, p. 778-84, Set. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22990969>. Acesso em: 8 dez. 2017.

VILLABRUNA, N.; KOOPMANS, M. P. G.; DE GRAAF, M. Animals as Reservoir for Human Norovirus. **Viruses**, Basel, v. 11, n. 5, 25 Mai. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31130647>. Acesso em: 8 dez. 2019.

VINJE, J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 53, n. 2, p. 373-81, Fev. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24989606>. Acesso em: 8 dez. 2017.

VOLPINI, L. P. B. *et al.* An outbreak due to a norovirus GII.Pe-GII.4 Sydney_2012 recombinant in neonatal and pediatric intensive care units. **J. Infect. Public Health**, Oxford, Jul. 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31281104>. Acesso em: 8 dez. 2019.

XI, J. N. *et al.* Norwalk virus genome cloning and characterization. **Science**, New York, v. 250, n. 4987, p. 1580-3, 14 Dez.1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2177224>. Acesso em: 8 dez. 2017.

XIAO, S.; TANG, J. W.; LI, Y. Airborne or Fomite Transmission for Norovirus? A Case Study Revisited. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, Basel, v. 14, n. 12, 14 Dez. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29240665>. Acesso em: 14 dez. 2017.

ZAHORSKY, J. Hyperemesis hemis or the winter vomit disease, **Arch Pediatr**, Paris, v. 46, p. 5, 1929.

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO PARA COLETA DOS MOLUSCOS

PROJETO NOROVIRUS – COLETA DOS MOLUSCOS

IDENTIFICAÇÃO	
1. Número da amostra no projeto <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 20px; margin: 5px auto;"></div>	2. Data da coleta ____/____/____
3. Hora da coleta ____:____	4. Quantidade de moluscos coletada _____ Kg
5. Local de coleta _____	6. Coordenadas _____
7. Espécie coletada _____	8. Origem da água consumida pela população 1. Lagos/rios <input type="checkbox"/> 2. Poços rasos 3. Poços profundos 4. Caminhão pipa 5. COMPEA 6. Outro _____
9. Método de produção 1. Coletadas em água marinha 2. Cultivados em cativeiro _____ <input type="checkbox"/> TIPO: Cultivo em Balsas; Cultivo em Mesa, Tabuleiros, Varal ou Rack; Cultivo em Long-Line (Espínel) ou em Linha	10. Identificação do catador/vendedor _____
11. Adquiridos de 1. Catador 2. Vendedor ambulante <input type="checkbox"/> 3. Não informado/outro	12. Condições de transporte 1. Temperatura ambiente <input type="checkbox"/> 2. Sob refrigeração
13. Temperatura do ambiente _____	14. Verificação da temperatura da água _____
17. Escoamento de efluentes humanos? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 3. Não informado	17. Escoamento de efluentes animais? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 3. Espécies de animais na área _____

Observações:

Responsável pelo preenchimento da ficha: _____

APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO NA *BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH*

Absence of norovirus contamination in shellfish harvested and commercialized in the Northeast coast of Brazil

Klarissa Miranda Guarines¹, Renata Pessôa Germano Mendes¹, Marli Tenório Cordeiro¹, Marize Pereira Miagostovich², Laura Helena Vega Gonzales Gil¹, Kim Y Green³, Lindomar José Pena^{1*}

¹Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil.

²Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro city, Rio de Janeiro, Brazil.

³Caliciviruses Section, Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.

*Corresponding author:

Lindomar Pena, PhD. Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz). Address: Avenida Professor Moraes Rego. Recife, Pernambuco, Brazil. Email: lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br

Abstract

Norovirus (NoV) is the main cause of gastroenteritis outbreaks all over the world. Although NoV spreads mainly from person to person, it is estimated that 14% of NoV outbreaks in developed countries are caused by foodborne transmission, a disease rate that could be higher in settings with poorer sanitation and hygiene. Bivalve mollusks are one of the most important foods involved in NoV transmission to humans. In Brazil, the virus has become the most detectable viral pathogen in acute gastroenteritis since the introduction of rotavirus vaccination. Little is known about NoV prevalence in shellfish harvested and commercialized in the country. The aim of this study was to map, for the first time, the distribution of NoV contamination in oysters and mussels harvested and commercialized in the coast of Pernambuco state, northeast Brazil. A total of 380 mollusks (260 oysters and 120 mussels) were collected between February and August 2017 either directly from harvesting areas or obtained from beach vendors in 17 sites in Pernambuco. Samples were processed and tested for NoV contamination using a SYBR Green real-time PCR assay. All samples were negative for NoV GI or GII contamination, suggesting a low risk of NoV contamination from this food source during the study period. Additional surveys in different areas of the Brazilian coast are warranted to monitor the risk of NoV infection upon seafood consumption.

Keywords: Norovirus; real time PCR; *Crassostrea rhizophorae*; *Mytella guyanensis*

1. Introduction

Norovirus (NoV) is the main cause of gastroenteritis outbreaks all over the world (Baldrige et al., 2016). Every year, NoV infections result in nearly 685 million cases and 200,000 deaths, causing significant economy impact (Li et al., 2017; Xiao et al., 2017). In Brazil, the virus has become the most detectable viral pathogen in acute gastroenteritis since the introduction of rotavirus vaccination, with detection rate from four to 50% (de Andrade et al., 2014; Ferreira et al., 2008; Nakagomi et al., 2008; O'Ryan et al., 2017; Ribeiro et al., 2008).

NoV are positive single strand RNA virus members of Caliciviridae family. Its genome has approximately 7.7kb and encodes three open reading frames (ORF 1-3) (Hardy, 2005). The Norovirus genus includes seven genogroups (GI-GVII) that infects different species. Human norovirus (HuNoVs) belong to genogroups GI, GII and GIV (Cortes-Penfield et al., 2017). NoV are transmitted by multiple routes, including person-to-person, through environment fomites, contaminated water and food. The virus can persist for long periods in the environment and as few as 18 virus particles are able to establish an infection (Lopman, 2015; Moore et al., 2015).

NoV transmission is most often mediated by direct human-to-human contact. However, it is estimated that 14% of NoV outbreaks in developed countries are caused by foodborne transmission, a rate could that can be higher in settings with poor hygiene and sanitation (Lopman, 2015). Mollusks are one of the most important foods involved on NoV transmission. They are known for their bioaccumulation capacity since they filter the surrounding environment where they live for feeding (Hassard et al., 2017). NoV is the principal agent detected in oysters-associated outbreaks of gastrointestinal disease (Alfano-Sobsey et al., 2012; Bellou et al., 2013; Elbashir et al., 2018; Woods et al., 2016).

The contamination of shellfish by NoV is influenced by numerous factors, including low solar radiation, low water temperature, low gage height, low salinity, heavy rainfall, and strong offshore wind. Among these variables, low water temperature is the most important indicator for oyster-associated NoV outbreaks (Chenar and Deng, 2018). Viral detection in these animals is important to evaluate water quality, which is usually based on bacterial parameters and does not viral agents. This can mask the actual quality of water and food consumed by the population (Vieira et al., 2012).

There is still much to be elucidated about the biology and ecology of this important foodborne pathogen (Moore et al., 2015). In Brazil, a few studies have detected HuNoV in shellfish harvested in South and Southeast Brazil (Keller et al., 2013; Souza et al., 2012; Souza et al., 2018). The Northeast region is one of the favorite travel destinations in Brazil because of its stunning coastline and rich seafood cuisine. One important state in the region is Pernambuco, where tourists and residents are usually attracted by its recreational waters and beach-related activities (Barbosa et al., 2018). NoV prevalence in humans in Pernambuco is about 7.9-19.6% (Nakagomi et al., 2008; Santos et al., 2017; Xavier et al., 2009). To the best of our knowledge, no study has investigated the presence of NoV in shellfish in the Northeast region of the country. Thus, the aim of this work was to investigate the presence of NoV contamination in oysters and mussels harvested and commercialized in the coast of Pernambuco state, Brazil.

2. Methods

2.1. Sampling

A total of 380 mollusks, 260 mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and 120 mangrove mussels (*Mytella guyanensis*), were collected between February and August 2017 for this study. They were acquired in natura directly from harvesting areas (n=250) or obtained from beach vendors (n=110). In some cases, samples were harvested directly from mangrove by the team members (n=20). A total of 17 sites were visited in the following coastal cities in Pernambuco state, Brazil: Goiana (Atapuz, Barra de Catuama, and Tejucopapo beaches), Itapissuma (Itapissuma beach), Itamaracá (Itamaracá and Pilar beaches), Sirinhaém (Barra de Sirinhaém beach), Recife (Boa Viagem, Brasília Teimosa, and Ilha de Deus beaches), Cabo de Santo Agostinho (Gaibu beach), Paulista (Maria Farinha and Pau Amarelo beaches), Ipojuca (Porto de Galinhas beach), Tamandaré (Tamandaré beach) (Figure 1).

Mollusks were transported under refrigeration, using chiller blocks, to the Virology Department of the Aggeu Magalhães Institute (Fiocruz). During collection, water temperature, ambient air temperature and source of the water consumed by population were recorded. For each site, 10 oysters and/or 20 mussels were collected.

2.2 Shellfish processing

Mollusks processing was performed as described by Jothikumar et al. (2005). First, animals were washed with running water and then shucked individually using a knife. Their digestive tissues were dissected using a sterile scalpel and transferred to Petri dishes, where they were finely chopped. Samples from the same site were weighed and pooled to form portions of 1-2g. After, the same volume of proteinase K at 100 µg/mL were added, samples were mixed and incubated for 60min at 37°C in a shaker incubator with agitation at 320 rpm. Samples were then incubated at 65°C during 15min in a water bath to inactivate proteinase K. Finally, samples were centrifuged at 3000x g for 5 min. Supernatant was kept under 4°C until RNA extraction.

2.3 RNA extraction

Viral RNA was extracted from 140 µL of processed shellfish supernatant using QIAmp® Viral RNA Mini kit (Qiagen, USA), according to the manufacturer's recommendations. RNA was eluted using 60 µL of AVE buffer and stored at -80°C until use.

2.4 NoV positive controls

Positive NoV GI and GII controls (fecal suspension) were gently provided by Dra Marize Miagostovich (Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ/RJ) and the Pernambuco Central Laboratory of Public Health (LACEN/PE), respectively. Controls were cloned, transcribed and used in all real-time RT-PCR reactions.

Specific fragments of NoV GI and GII were amplified by conventional RT-PCR using ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA) and GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. We used previously designed primers (Jothikumar et al., 2005; Kageyama et al., 2003) that target the conserved region at the ORF1-ORF2 junction of the genome (Table 1). Amplicons were purified with the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare Life Sciences, USA) and cloned into the pGEM®-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) using 1:3 or 1:8 vector:insert molar ratios. NoV positive clones were confirmed by colony PCR using the same primers used for cloning and by Sanger sequencing. In brief, purified amplicons were sequenced using the same primers used for cloning and the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequencing was performed on an ABI Prism 3100 Capillary Automatic DNA Analyzer. Sequences were

analyzed using the Bioedit software, v7.0.5 (Carlsbad, CA, USA) and submitted to Blast analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) to confirm NoV identity.

In vitro transcription was carried out using SacII-linearized plasmids and the MEGAscript® SP6 Transcription Kit (Ambion, Life Technologies Corporation, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. Briefly, the digested product was purified using Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare Life Sciences, USA). Next, transcription reactions were performed with 8 µL of linearized plasmid DNA, 2 µL of 10x Sp6 buffer, 2 µL of each phosphate ribonucleotide (ATP, GTP, CTP and UTP) and 2 µL of Sp6 enzyme. RNA was treated with 5 µL of TURBO™ DNase (Ambion, Life Technologies Corporation, CA, USA) per reaction and incubated at 37°C for 30 minutes. Transcribed RNAs were treated with 115 µL of nuclease free water and 15 µL of ammonia acetate. RNA was precipitated with 310 µL of ethanol, and then resuspended and eluted in 36 µL of nuclease free water and 4 µL of RNaseOut® (Invitrogen, CA, USA).

To determine the analytical sensitivity of real-time RT-PCR, serial 10-fold dilutions (from 10¹ to 10¹¹ copies/µL) of an *in vitro*-transcribed NoV GI or GII RNA were made in nuclease-free water and used for the assays. All experiments were done in duplicate. RNA copy number was calculated based on the formula:

$$\frac{\text{RNA concentration (g/}\mu\text{l)}}{\text{Transcript size (bp)} \times 340} \times 6,022 \times 10^{23}$$

The standard curve was also used for viral quantification in unknown samples.

2.5 Oyster spike experiments

Oysters were artificially contaminated with serial 10-fold dilutions of a NoV positive sample to analyze the sensitivity of the real-time RT-PCR assay. This experiment also allowed determining the absence of real-time RT-PCR inhibitors in oyster samples. Briefly, one gram of dissected oyster diverticulum was spiked with 100 µL of serially diluted (undiluted to 1:10,000 dilution) NoV GII-positive fecal suspension (2.7x10⁴ copies/µL) and then processed as described above.

2.6 NoV molecular detection

Real-time RT-PCR was performed using the GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, WI, USA) and the primers described in Table 1, which have been previously designed by Jothikumar et al. (2005) and Kageyama et al. (2003). The 20 µL reaction was carried out using 10 µL of GoTaq® qPCR Master Mix 2X, 6µM of each specific primer, 0.18 µL of CXR reference dye, 0.4 µL of GoScript® RT Mix, 6.22 µL of nuclease free water and 2 µL of RNA. We performed NoV GI and NoV GII amplifications separately. PCR conditions were as follows: RT at 50°C for 30min; initial denaturation at 95°C for 10min; 40 cycles of 95°C for 10s, 60°C for 30s and 72° for 30s, finishing with melting curve. Positive (standard curve) and non-template (nuclease-free water) controls were used in every experiment. All PCR reactions were run in duplicate. Melt curve analysis was carried out using the Applied Biosystems 7500 Software v2.0.6 (Life Technologies, CA, USA).

2.7 Statistical analysis

All statistical analysis were performed using the GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and the IBM SPSS Statistics 22.0 (Armonk, New York, USA) softwares. Statistically significant differences were defined as $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Shellfish sampling

A total of 380 mollusks (260 oysters and 120 mussels) were collected between February and August 2017 along the entire coast of Pernambuco state, northeast Brazil (Figure 1). A total of 17 sites were visited, in three seasons (fall, summer and winter), totalizing 30 visits. In each site, 10 oysters and/or 20 mussels were collected. Beaches names, number of samples collected and seasons when sites were visited are shown in Figure 2. All animals were processed and the digestive tissue of samples from the same site were pulled together to form portions of 1-2g. At the end, 233 tissue samples were obtained. RNA was extracted from all these samples and kept at -80°C until real-time RT-PCR.

3.2 Sample characterization

The majority of mollusks collected for this study were wild-caught (96.7%) and only small fraction was farm-raised (Figure 3A). Most shellfish samples were obtained from fishermen ($n = 250$), followed by beach vendors ($n = 110$) and the research team ($n = 20$) (Figure 3B). The main source of water consumed by population in the beaches visited was provided by Compesa (73.3%), a community water system company responsible for water supply and sanitation services in Pernambuco state. In addition, 20% of drinking water was provided from deep wells sources and 6.7% from shallow wells (Figure 3C).

During visits, water and ambient temperatures were also measured and recorded. The mean of ambient temperature was 28.7°C (25-35°C \pm 2.092). Average water temperature was 30.37°C (20-35°C \pm 3.201) (Figure 3D).

3.3 One-step SYBR® Green real-time RT-PCR standardization

In order to detect NoV contamination in shellfish, we first developed a one-step SYBR® Green real-time RT-PCR assay using previously designed primers (Jothikumar et al., 2005; Kageyama et al., 2003). Positive NoV GI and GII controls were amplified from human fecal suspension and cloned into a plasmid. Successful cloning of desired inserts was confirmed by colony PCR and Sanger sequencing of plasmids (data not shown). NoV RNA was produced by in vitro transcription of plasmids and quantified by spectrometry. RNA concentration obtained was 4.85x10¹² ssRNA copies/ μ l for GI and 4.79x10¹² ssRNA copies/ μ l for GII.

Serial 10-fold dilution of transcribed NoV RNA was used to construct standard curves using concentrations varying from 10¹ to 10⁸ copies/ μ L. The detection limit of the real-time RT-PCR assay was defined as 4.85x10⁴ ssRNA copies/ μ L for NoV GI and 4.79x10² ssRNA copies/ μ L for NoV GII. However, linearity of RNA amplification was obtained using 4.85x10⁵-4.85 x10⁸ copies for GI and 4.79x10⁴ - 4.79x10⁸ copies for GII, with efficiency of 100% and 105%, respectively (Figure 4).

To determine the assay sensitivity and analyze the processing protocol, a spike curve in oysters was constructed using a positive stool sample. Approximately 2.7x10⁴ ssRNA copies/ μ L of NoV GII RNA was used to perform the spike experiment. This sample was diluted until 2.7 copies/ μ L creating a 10-fold dilution curve. Each dilution was inoculated into 1g portions of oyster digestive tissue and samples were processed for RNA extraction. Under this condition, the real-time RT-PCR was capable to detect NoV up to 2.7x10³ copies/ μ L concentration point.

3.4 Analysis of shellfish samples for NoV contamination

All 233 samples were tested in duplicate for NoV GI and NoV GII, together with NoV transcribed RNA (standard curve) and non-template controls, by the one-step SYBR® Green real-time RT-PCR assay. None of the shellfish samples had detectable NoV contamination (Figure 5A).

Melt curve analysis was done to discriminate between the negative (water controls and negative shellfish samples) and positive NoV. Amplification of NoV GII positive controls produced amplicons with a melting temperature 7°C higher than negative samples (80°C versus 73°C), which allowed a clear differentiation between positive and negative samples (Figure 5B). Amplification of NoV GI controls produced similar melt curve pattern (data not shown)

4. Discussion

Information about NoV prevalent in shellfish harvested and commercialized in Brazil is scarce and incomplete. This study comprises the first survey of the occurrence of NoV in bivalve mollusks harvested and commercialized in the coast of Pernambuco state, northeast Brazil. To fill this gap of knowledge, a total of 380 bivalve mollusks were collected from harvesting areas or obtained from beach vendors in 17 sites in the state of Pernambuco and tested for both NoV GI and NoV GII by real-time RT-PCR.

One major obstacle in the laboratory diagnosis of NoV infection is the lack of a tissue culture system for propagating the viruses (Cotton et al., 2017). Thus, RT-PCR has been increasingly used for NoV detection around the world (de Andrade et al., 2014; Jothikumar et al., 2005; Kageyama et al., 2003; Scipioni, Bourgot, et al., 2008). The development of new techniques for rapid detection and molecular characterization of NoV is highly desirable for better understanding of NoV epidemiology (Campos and Lees, 2014). In this study, we standardized a rapid and inexpensive diagnostic tool for NoV detection in shellfish based on real-time RT-PCR with SYBR Green technology. Positive RNA controls for RT-PCR were produced by in vitro transcription of cloned cDNA, a method that allows production of RNA controls in large quantities for diagnostics purposes. The use of RNA standard curves also enables viral load determination in chosen samples (Scipioni, Bourgot, et al., 2008).

Despite being a cheaper alternative, SYBR Green sensitivity is usually lower when compared to TaqMan® or methods involving the use of probes (Gunson and Carman, 2005). In our spike experiment, we showed a sensitivity of 2.7×10^3 RNA copies/ μL for real-time RT-PCR and proved that there was no significant influence of oyster's inhibitors on virus detection. Standard RNA curve could detect 4.85×10^4 copies of NoV GI and 4.79×10^2 copies of NoV GII. This sensitivity was higher than the one described by Scipioni, Mauroy, et al. (2008) who obtained linearity in NoV amplification in human stool samples in the range of 5.8×10^6 to 5.8×10^{11} copies. Similar results were also obtained by Radin and D'Souza (2011) who developed a SYBR Green-based real-time RT-PCR for NoV detection in lettuce, cherry tomatoes, and green onions. Recently, Oshiki and co-workers developed a microfluidic nested PCR amplification method for NoV detection in oyster and found that the assay could detect 102-105 copies/g digestive tissue (Oshiki et al., 2018). Thus, our one-step SYBR® Green real-time RT-PCR assay shows potential for routine use in diagnostics and monitoring of NoV contamination in mollusks.

Bivalve mollusks are an important source of NoV contamination and have been linked to several outbreaks in humans (Hassard et al., 2017; Woods et al., 2016). Scientists all over the world have done NoV survey studies in mollusks, but the majority of investigations have been undertaken in countries with temperate climate (Brake et al., 2014; Costantini et al., 2006; Jothikumar et al., 2005; Le Mennec et al., 2017; Oshiki et al., 2018; Seo et al., 2014). These studies have obtained a variable detection rate. For example, Torok et al. (2018) conducted a national prevalence survey for NoV in total of 300 oyster harvested Australia and did not find any positive samples. Low prevalence of NoV in shellfish or even absence of contamination has also been reported in other countries such as Greece, India, Japan, The Netherlands, Norway, and Spain (Woods et al., 2016). On the other hand, high prevalence of NoV contamination has also been reported. For instance, Le Mennec et al. (2017) detected 65% NoV positivity in oysters from a production area repeatedly implicated in oyster-related gastroenteritis in France. It is hard to compare different studies because there are variables such as the use of distinct processing and detection methods, virus stability, water temperature and season (DePaola et al., 2010; Torok et al., 2018).

In Brazil, only a few groups had investigated NoV contamination in shellfish in the South and Southeast regions of the country. The detection rate in these studies has varied from 0 to 4.8% (Keller et al., 2013; Souza et al., 2012; Souza et al., 2018).

This study was the first to investigate NoV contamination in shellfish from the Northeast region of the country. All 380 oysters and mussels samples collected were negative for NoV GI and GII, suggesting a very low prevalence of NoV in these animals. In agreement with this Souza et al. (2012) did not detect any NoV GI or NoV GII positive samples in oysters harvested in regular cultivation areas in South Brazil. Our results are also in accordance with the ones described by Souza et al. (2018). They collected samples of *Anomalocardia brasiliensis* clam monthly between November 2014 and April 2016 in South Brazil and found only two positive for NoV GI and none for NoV GII. Keller et al. studied bacterial and enterovirus contamination in shellfish harvested in an area impacted by a continuous discharge of domestic sewage in Southeast Brazil. Although they detected high prevalence adenovirus and rotavirus contamination in both water and mussel samples, NoV was found in only 4.8% of water samples and was not detected in the mussels (Keller et al., 2013).

It is important to analyze all factors involved in mollusks contamination, improving epidemiological surveillance data. Detailed information of these elements could help measuring contamination risk and prevent foodborne transmission (Campos and Lees, 2014). Oyster-associated NoV outbreaks are influenced by the sum of different factors, such as low solar radiation, low water temperature, low gage height, low salinity, heavy rainfall, and strong offshore wind (Chenar and Deng, 2018).

Often, NoV outbreaks occur in winter and cold months (Campos et al., 2013; Duizer et al., 2004). Low temperature is a prime factor for viral prevalence and viral load in oyster. Higher viral concentrations were found in oysters collected in waters with a temperature under 5°C than in oysters collected in areas with temperature above 10°C. The processes of bioaccumulation and purification of oysters may also be compromised due to the decrease of its metabolism associated with low temperatures (Campos et al., 2017).

To determine the possible seasonal variation of NoV prevalence, we visited collection areas in different months. However, the Northeast Brazil is warm region, with high incidence of solar radiation almost year round and the seasons are not well defined. The mean temperature of water and ambient in our study were 30.37 and 28.7°C, respectively. Chenar and Deng (2018) predicted that high temperatures and high solar radiation were the two major factors that reduce the risk of NoV contamination. The high solar radiation increases temperatures and UV rays incidence, promoting NoV inactivation and decreasing its stability. The high water

temperature associated with oyster harvest for human consumption in suitable catchment areas in Pernambuco may explain the absence of detectable NoV contamination in our study.

5. Conclusions

Monitoring risks of NoV infections is extremely important to prevent outbreaks among shellfish consumers and contribute to improvement of the estuarine environment. Our results suggest that the food safety risk related to NoV acquisition from shellfish harvested and commercialized in Pernambuco was low for the study period. Results of the current survey provide important information for the gastronomic tourism in Pernambuco and for the shellfish production chain in Northeast Brazil. Additional studies in other coastal states in Brazil are warranted to determine the prevalence of NoV in bivalve mollusks and will contribute to understand the ecoepidemiology of NoV infection in tropical countries.

Acknowledgements

We would like to thank the Pernambuco Central Laboratory of Public Health (LACEN/PE) and Dra. Marize Miagostovich (Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ/RJ) for gently providing the positive NoV controls. This work was supported by the Foundation for Science and Technology of Pernambuco (FACEPE – APQ-03422.12). KMG is a recipient of a doctoral fellowship from CAPES; LRM is a recipient of a doctoral fellowship from FACEPE; R.P.G.M is a recipient of a Scientific Initiation fellowship (PIBIC) from CNPq (The National Council for Scientific and Technological Development, Brazil). The funders had no role in study design, sample collection and analyses of results, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests

All authors have declared that no competing interests exist.

References

Alfano-Sobsey, E., Sweat, D., Hall, A., Breedlove, F., Rodriguez, R., Greene, S., Pierce, A., Sobsey, M., Davies, M., Ledford, S.L., 2012. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiol Infect* 140, 276-282.

Baldrige, M.T., Turula, H., Wobus, C.E., 2016. Norovirus Regulation by Host and Microbe. *Trends Mol Med* 22, 1047-1059.

Barbosa, C.S., Gomes, E.C.S., Loyo, R.M., Cavalcanti, M.I.S.B.M., Silva, I.E.P., Almeida, A.S., Souza-Santos, R., 2018. Insalubrious touristic environments and schistosomiasis transmission in Pernambuco, Brazil. *Rev. Ambient. Água* 13, 10.

Bellou, M., Kokkinos, P., Vantarakis, A., 2013. Shellfish-borne viral outbreaks: a systematic review. *Food Environ Virol* 5, 13-23.

Brake, F., Ross, T., Holds, G., Kiermeier, A., McLeod, C., 2014. A survey of Australian oysters for the presence of human noroviruses. *Food Microbiol* 44, 264-270.

Campos, C.J., Lees, D.N., 2014. Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters. *Appl Environ Microbiol* 80, 3552-3561.

Campos, C.J.A., Avant, J., Lowther, J., Till, D., Lees, D., 2013. Levels of Norovirus and *E. coli* in Untreated, Biologically Treated and UV-Disinfected Sewage Effluent Discharged to a Shellfish Water. *Journal of Water Resource and Protection* 5, 978-982.

Campos, C.J.A., Kershaw, S., Morgan, O.C., Lees, D.N., 2017. Risk factors for norovirus contamination of shellfish water catchments in England and Wales. *Int J Food Microbiol* 241, 318-324.

Chenar, S.S., Deng, Z., 2018. Development of genetic programming-based model for predicting oyster norovirus outbreak risks. *Water Res* 128, 20-37.

Cortes-Penfield, N.W., Ramani, S., Estes, M.K., Atmar, R.L., 2017. Prospects and Challenges in the Development of a Norovirus Vaccine. *Clin Ther* 39, 1537-1549.

Costantini, V., Loisy, F., Joens, L., Le Guyader, F.S., Saif, L.J., 2006. Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Appl Environ Microbiol* 72, 1800-1809.

Cotton, B.T., Hyde, J.L., Sarvestani, S.T., Sosnovtsev, S.V., Green, K.Y., White, P.A., Mackenzie, J.M., 2017. The Norovirus NS3 Protein Is a Dynamic Lipid- and Microtubule-Associated Protein Involved in Viral RNA Replication. *J Virol* 91.

de Andrade, J.S.R., Rocha, M.S., Carvalho-Costa, F.A., Fioretti, J.M., Xavier Mda, P., Nunes, Z.M., Cardoso, J., Fialho, A.M., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., 2014. Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. *J Clin Virol* 61, 345-352.

DePaola, A., Jones, J.L., Woods, J., Burkhardt, W., 3rd, Calci, K.R., Krantz, J.A., Bowers, J.C., Kasturi, K., Byars, R.H., Jacobs, E., Williams-Hill, D., Nabe, K., 2010.

Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey. *Appl Environ Microbiol* 76, 2754-2768.

Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., De Groot, A., Twisk, F., Koopmans, M., 2004. Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 70, 4538-4543.

Elbashir, S., Parveen, S., Schwarz, J., Rippen, T., Jahncke, M., DePaola, A., 2018. Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review. *Food Microbiol* 70, 85-93.

Ferreira, M.S., Xavier, M.P., Fumian, T.M., Victoria, M., Oliveira, S.A., Pena, L.H., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., 2008. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. *J Med Virol* 80, 338-344.

Gunson, R.N., Carman, W.F., 2005. Comparison of two real-time PCR methods for diagnosis of norovirus infection in outbreak and community settings. *J Clin Microbiol* 43, 2030-2031.

Hardy, M.E., 2005. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* 253, 1-8.

Hassard, F., Sharp, J.H., Taft, H., LeVay, L., Harris, J.P., McDonald, J.E., Tuson, K., Wilson, J., Jones, D.L., Malham, S.K., 2017. Critical Review on the Public Health Impact of Norovirus Contamination in Shellfish and the Environment: A UK Perspective. *Food Environ Virol* 9, 123-141.

Jothikumar, N., Lowther, J.A., Henshilwood, K., Lees, D.N., Hill, V.R., Vinje, J., 2005. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Appl Environ Microbiol* 71, 1870-1875.

Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K., 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 41, 1548-1557.

Keller, R., Justino, J.F., Cassini, S.T., 2013. Assessment of water and seafood microbiology quality in a mangrove region in Vitoria, Brazil. *J Water Health* 11, 573-580.

Le Mennec, C., Parnaudeau, S., Rumebe, M., Le Saux, J.C., Piquet, J.C., Le Guyader, S.F., 2017. Follow-Up of Norovirus Contamination in an Oyster Production Area Linked to Repeated Outbreaks. *Food Environ Virol* 9, 54-61.

Li, J., Pan, H., Xiao, W.J., Gong, X.H., Zhuang, Y., Kuang, X.Z., Wu, H.Y., Yuan, Z.A., 2017. [Epidemiological and etiological surveillance study of infectious diarrhea in Shanghai in 2013-2015]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 51, 1113-1117.

Lopman, B., 2015. Global Burden of Norovirus and Prospects for Vaccine Development. CDC Foundation CDC Foundation.

Moore, M.D., Goulter, R.M., Jaykus, L.A., 2015. Human norovirus as a foodborne pathogen: challenges and developments. *Annu Rev Food Sci Technol* 6, 411-433.

Nakagomi, T., Correia, J.B., Nakagomi, O., Montenegro, F.M., Cuevas, L.E., Cunliffe, N.A., Hart, C.A., 2008. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol* 153, 957-960.

O'Ryan, M., Riera-Montes, M., Lopman, B., 2017. Norovirus in Latin America: Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J* 36, 127-134.

Oshiki, M., Miura, T., Kazama, S., Segawa, T., Ishii, S., Hatamoto, M., Yamaguchi, T., Kubota, K., Iguchi, A., Tagawa, T., Okubo, T., Uemura, S., Harada, H., Kobayashi, N., Araki, N., Sano, D., 2018. Microfluidic PCR Amplification and MiSeq Amplicon Sequencing Techniques for High-Throughput Detection and Genotyping of Human Pathogenic RNA Viruses in Human Feces, Sewage, and Oysters. *Front Microbiol* 9, 830.

Radin, D., D'Souza, D.H., 2011. Simple and Rapid Detection of Human Norovirus from Produce Using SYBR Green I-based Real-time RT-PCR. *Food Environ Virol* 3, 121.

Ribeiro, L.R., Giuberti, R.S., Barreira, D.M., Saick, K.W., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., Spano, L.C., 2008. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103, 201-206.

Santos, V.S., Gurgel, R.Q., Cavalcante, S.M., Kirby, A., Cafe, L.P., Souto, M.J., Dolabella, S.S., de Assis, M.R., Fumian, T.M., Miagostovich, M.P., Cunliffe, N.A., Cuevas, L.E., 2017. Acute norovirus gastroenteritis in children in a highly rotavirus-vaccinated population in Northeast Brazil. *J Clin Virol* 88, 33-38.

Scipioni, A., Bourgot, I., Mauroy, A., Ziant, D., Saegerman, C., Daube, G., Thiry, E., 2008. Detection and quantification of human and bovine noroviruses by a TaqMan RT-PCR assay with a control for inhibition. *Mol Cell Probes* 22, 215-222.

Scipioni, A., Mauroy, A., Ziant, D., Saegerman, C., Thiry, E., 2008. A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition. *Virol J* 5, 94.

Seo, D.J., Lee, M.H., Son, N.R., Seo, S., Lee, K.B., Wang, X., Choi, C., 2014. Seasonal and regional prevalence of norovirus, hepatitis A virus, hepatitis E virus, and rotavirus in shellfish harvested from South Korea. *Food Control* 41, 178-184.

Souza, D.S., Ramos, A.P., Nunes, F.F., Moresco, V., Taniguchi, S., Leal, D.A., Sasaki, S.T., Bicego, M.C., Montone, R.C., Durigan, M., Teixeira, A.L., Pilotto, M.R., Delfino, N., Franco, R.M., Melo, C.M., Bairy, A.C., Barardi, C.R., 2012. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. *Ecotoxicol Environ Saf* 76, 153-161.

Souza, D.S.M., Dominot, A.F.A., Moresco, V., Barardi, C.R.M., 2018. Presence of enteric viruses, bioaccumulation and stability in *Anomalocardia brasiliensis* clams (Gmelin, 1791). *Int J Food Microbiol* 266, 363-371.

Torok, V., Hodgson, K., McLeod, C., Tan, J., Malhi, N., Turnbull, A., 2018. National survey of foodborne viruses in Australian oysters at production. *Food Microbiol* 69, 196-203.

Vieira, C.B., Mendes, A.C., Guimaraes, F.R., Fumian, T.M., Leite, J.P., Gaspar, A.M., Miagostovich, M.P., 2012. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107, 778-784.

Woods, J.W., Calci, K.R., Marchant-Tambone, J.G., Burkhardt, W., 3rd, 2016. Detection and molecular characterization of norovirus from oysters implicated in outbreaks in the US. *Food Microbiol* 59, 76-84.

Xavier, M.P., Oliveira, S.A., Ferreira, M.S., Victoria, M., Miranda, V., Silva, M.F., Strina, A., Barreto, M.L., Miagostovicht, M.P., Leite, J.P., 2009. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res* 42, 438-444.

Xiao, S., Tang, J.W., Li, Y., 2017. Airborne or Fomite Transmission for Norovirus? A Case Study Revisited. *Int J Environ Res Public Health* 14.

Table 1. Primers used in the study

Primer	Sequence	Reference
JJV1F	GCC ATG TTC CGI TGG ATG	Jothikumar et al. (2005)
JJV1R	TCC TTA GAC GCC ATC ATC AT	Jothikumar et al. (2005)
JJV2F	CAA GAG TCA ATG TTT AGG TGG ATG AG	Jothikumar et al. (2005)
COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	Kageyama et al. (2003)

Note: JJV1F and JJV1R primers amplify NoV GI strains while JJV2F and COG2R primers are specific NoV GII.

Figure legends

Figure 1. Study area. The map shows all states in Brazil and gray-shaded area is Pernambuco, where the study was carried out. Colored areas indicate the counties visited for shellfish collection.

Figure 2. Beach names, number of samples and seasons when samples were collected.

Figure 3. Sample characterization. (A) Source of shellfish. (B) Origin of samples obtained. (C) Source of water consumed by the population. (D). Water and ambient temperature at time of collection.

Figure 4. One-step SYBR® Green real-time RT-PCR assay for NoV GI (A and B) and GII (C and D). The linearity of the SYBR® Green real-time RT-PCR assay was determined using a serially 10-fold diluted NoV RNA transcribed from plasmids containing either the NoV GI (A) or GII (C) targeted region. (B) Standard curve generated from amplification of NoV GI (B) or GII (D) by real-time RT-PCR.

Figure 5. Analysis of shellfish samples for NoV contamination. (A) Shellfish samples were processed and tested for NoV contamination by real-time RT-PCR along with positive and negative controls. (B) Melt curve analysis to discriminate between NoV positive and negative samples.

Fig 1

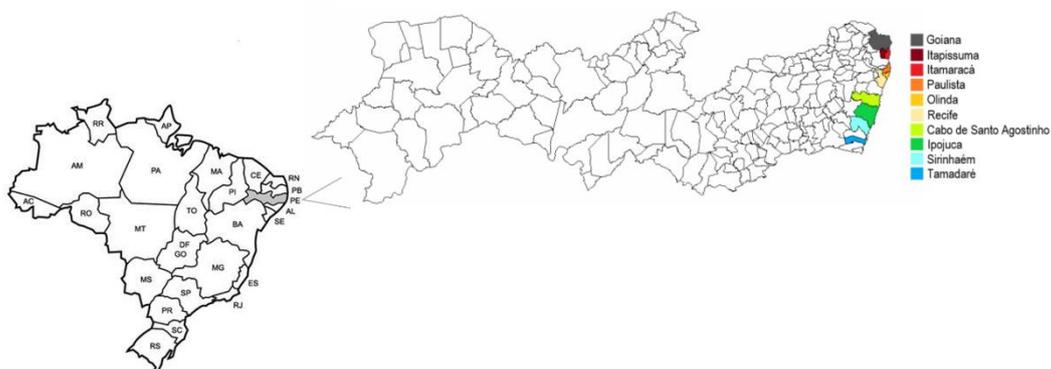


Fig 2

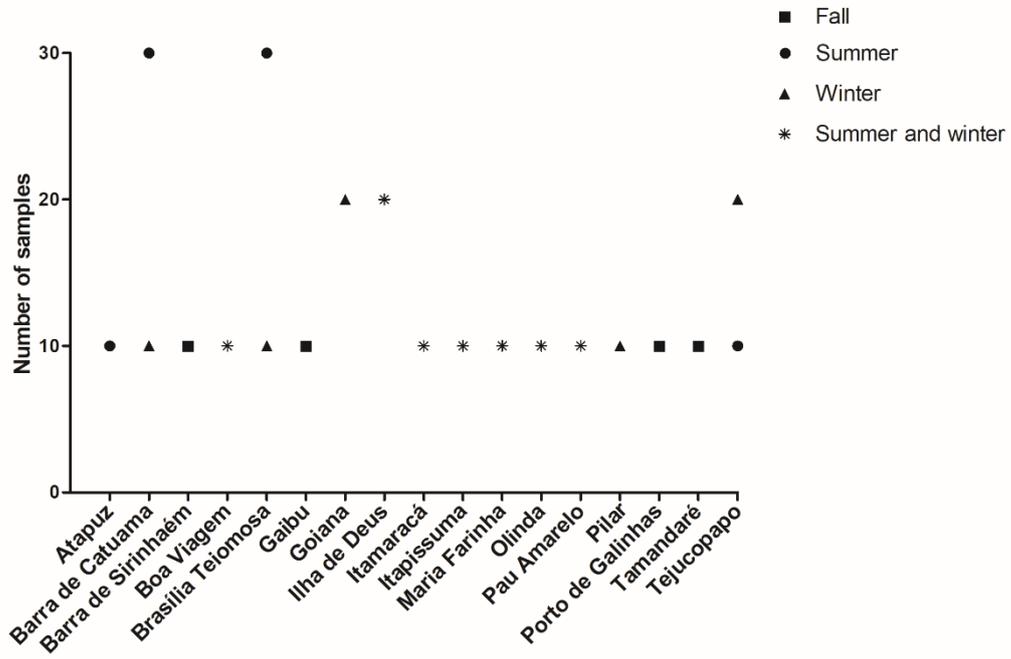


Fig 3

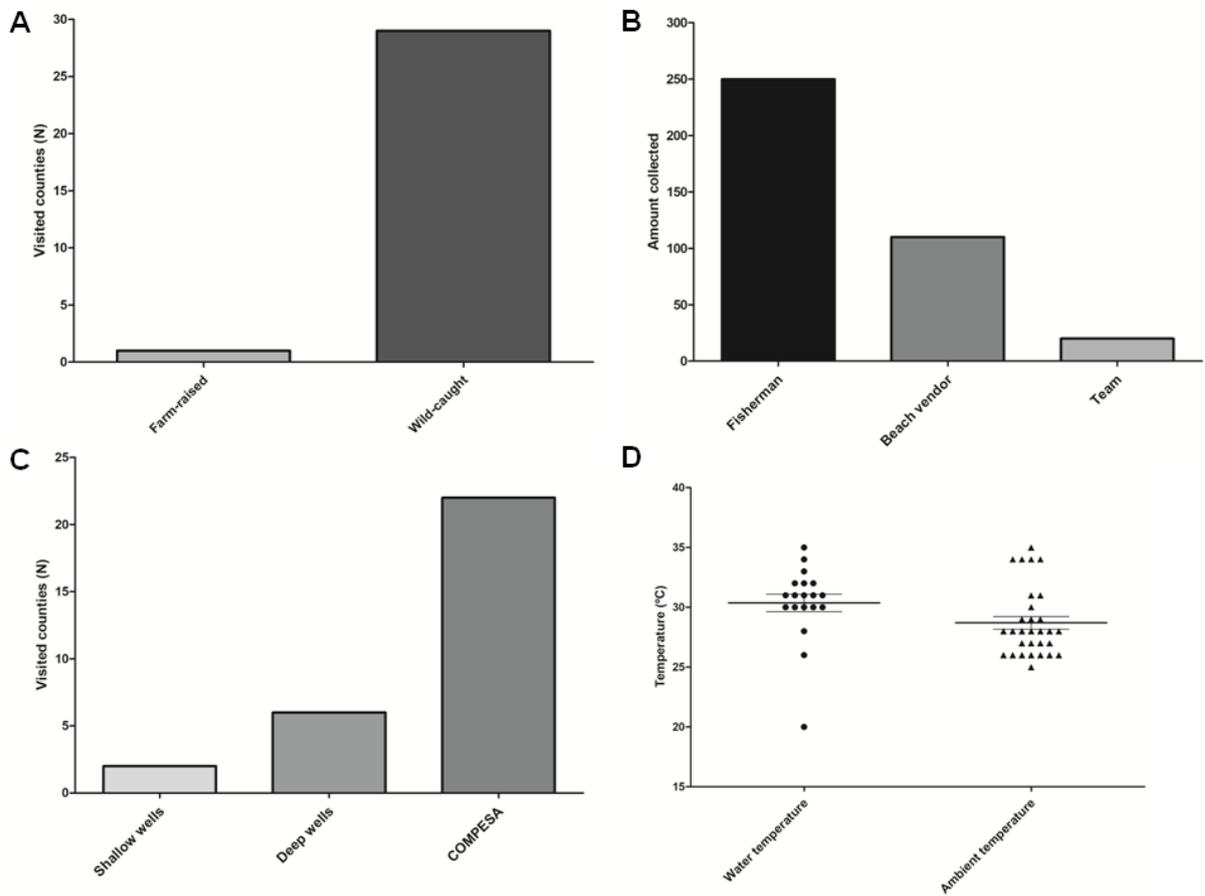


Fig 4

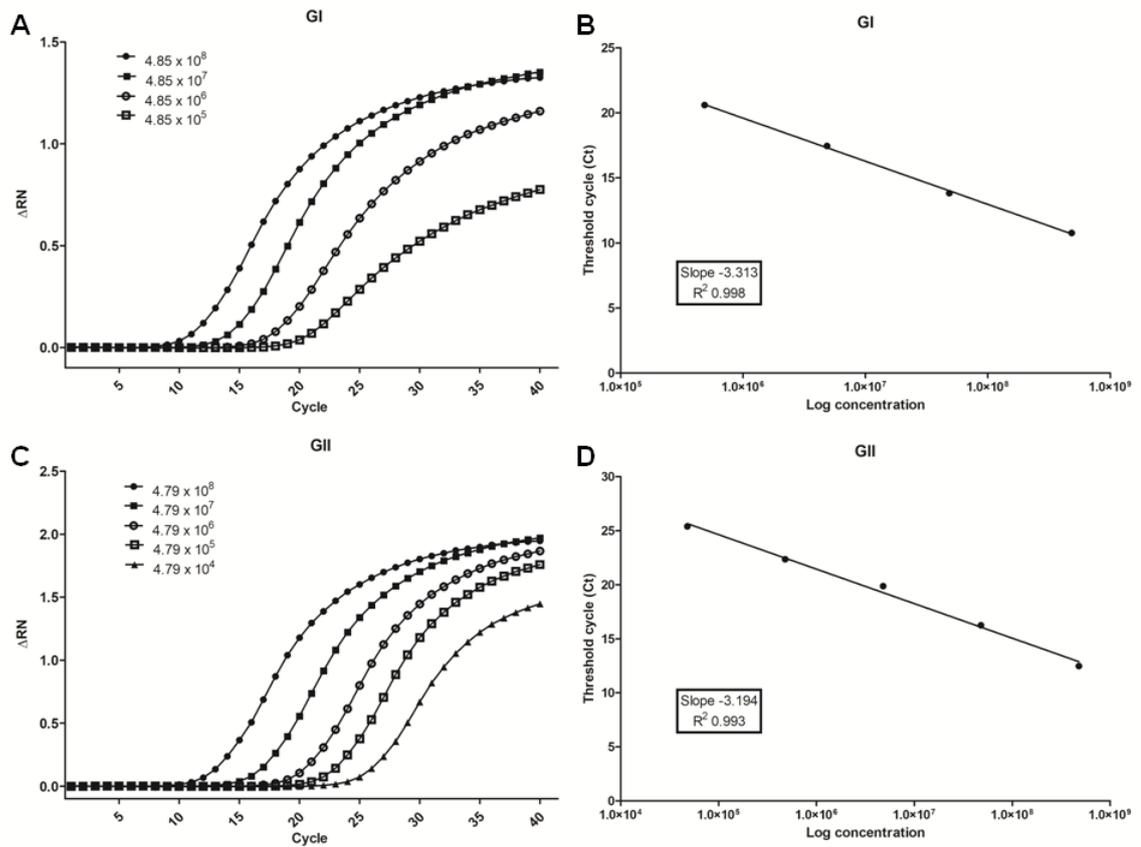
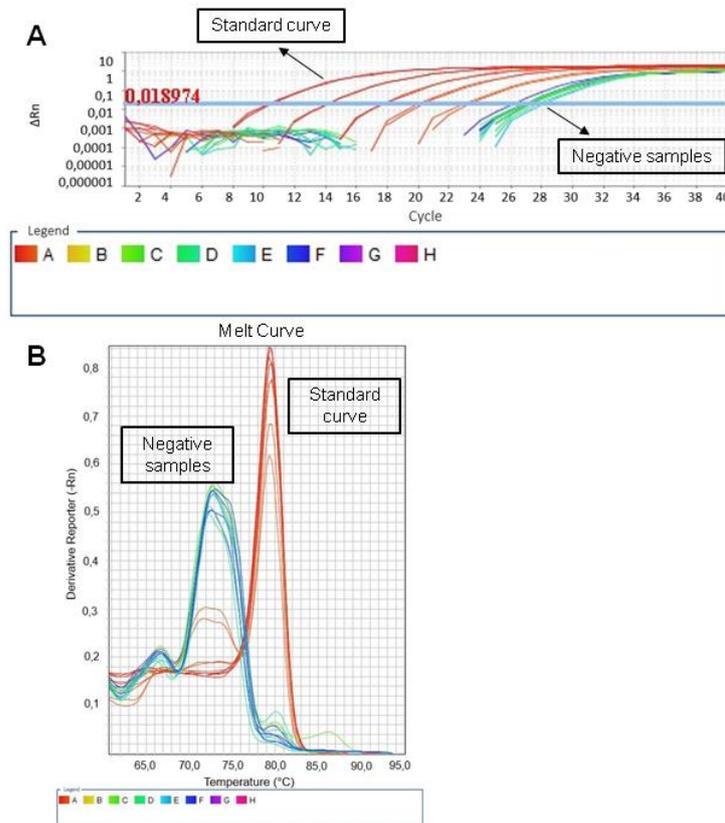


Fig 5



APÊNDICE C – Artigo publicado na *Journal of Medical Virology*

Received: 30 August 2019 | Accepted: 15 November 2019
DOI: 10.1002/jmv.25621

RESEARCH ARTICLE

JOURNAL OF
MEDICAL VIROLOGY WILEY

Norovirus-associated gastroenteritis, Pernambuco, Northeast Brazil, 2014-2017

Klarissa M. Guarines¹ | Renata P. G. Mendes¹ | Jurandy J. F. de Magalhães^{1,2} | Lindomar Pena¹ 

¹Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil

²Department of Virology, Pernambuco State Central Laboratory (LACEN/PE), Recife, Pernambuco, Brazil

Correspondence

Lindomar Pena, PhD, Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Avenida Professor Moraes Rêgo, Recife, Pernambuco, Brazil. Email: lindomar.pena@pam.fiocruz.br

Funding information

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Grant/Award Number: APO-00422-12-15

Abstract

Norovirus (NoV) is currently the leading cause of nonbacterial gastroenteritis. In Brazil, few studies have characterized the molecular, epidemiological and clinical features of NoV-associated gastroenteritis. This study aimed to describe the molecular and clinicoepidemiological findings of NoV infections in patients of all ages throughout Pernambuco state, Northeast Brazil. Thus, 1135 stool samples were analyzed from patients with gastroenteritis from Pernambuco state. NoV was detected by enzyme immunoassay in 125 (11.01%) samples. Regarding gender distribution, 55 (44.00%) patients were female and 70 (56.00%) male. Their ages ranged from 5 days to 87 years, and the group most affected by NoV infection (80.00%) was children under 3 years. Complete clinical information was available for 88 out of 125 NoV-positive patients. Diarrhea was present in all patients and vomiting was reported in 60 patients (68.68%). Nine patients (10.22%) had bloody stools and 46 (52.27%) had a fever, with temperatures ranging from 37.90°C to 39.90°C (mean 38.20°C). NoV was detected mainly in the summer-autumn seasons. Genome sequencing and phylogenetic analyses identified four different NoV GI genotypes circulating in this area of the country. Therefore, our study provided valuable information about the clinics and epidemiology of NoV infection in tropical settings and will assist health authorities to develop better control strategies against this important pathogen.

KEYWORDS

acute gastroenteritis, Brazil, epidemiology, human NoV infection, molecular, norovirus

1 | INTRODUCTION

Diarrheal disease is the fourth most common cause of death and the second most common cause of morbidity worldwide.¹ Norovirus (NoV) is currently the leading cause of nonbacterial gastroenteritis affecting people of all ages, representing approximately one-fifth of all diarrhea cases. It causes more than 200 000 deaths annually in developed countries.² In Latin America, NoV is also the main cause of acute gastroenteritis (AGE) outbreaks, representing 15% of the cases.³

NoV belongs to the Caliciviridae family, which is subdivided into five genera: Vesivirus, Calicivirus, Nebovirus, Sapovirus, and Norovirus.⁴ It is a nonenveloped virus composed of a single-strand positive-sense RNA genome. Its RNA has 7.4 to 7.7 kb in length and is typically organized into three open reading frames (ORF). On the basis of the phylogenetic analyses, NoV is currently classified into 10 genogroups (GI–G10). These genogroups are further subclassified into more than 49 genotypes.⁵ Genogroups GI, GII, and GIV are responsible for human infections. The GII genotype 4 (GII.4) has been the most detected genotype in outbreaks since 2002, is associated with a large number of cases of AGE worldwide.⁶ However, since 2014 the GII.17 genotype has received more attention as this genotype has spread from Asia to other countries.⁷

Klarissa M. Guarines and Renata P. G. Mendes contributed equally to this study.

The development of molecular methods and enzyme immunoassays (EIAs) for diagnosis has allowed rapid identification of NoV outbreaks and has brought into sight the public health impact of the infection. NoV transmission occurs primarily through the fecal-oral route. However, it can also be transmitted by direct contact from person to person, by consumption of contaminated food and water. Large NoV outbreaks have been commonly reported in hospitals, cruise ships, schools, daycare centers, universities, and restaurants.⁸

Several factors likely contributed to the high contagiousness of NoV, including its low infectious dose (only 18 virus particles), the high viral loads shed by infected individuals for long periods of time, the long NoV persistence in the environment and lack of long-lasting immunity upon contact with the virus.⁹ In humans, NoV infection is manifested by diarrhea, vomiting, nausea, cramps, low fever, headache, chills, muscle aches, and fatigue. Symptoms usually appear 12 to 48 hours after contact with the virus. The disease is normally self-limiting and most people show improvement after 1 to 3 days of the clinical course.^{10,11}

In Brazil, few studies have investigated NoV epidemiology in humans and most of them were done in the North and Southeast region of this continental country.¹²⁻¹⁸ A single study was carried out in the city of Recife, the capital of Pernambuco state, which is located in the northeast region.²⁴ In most of these studies, the focus had been only the molecular characterization of the virus. Thus, there is a lack of data on the epidemiological and clinical features of NoV-associated gastroenteritis. Here, our goal was to describe the molecular and clinicoepidemiological features of laboratory-confirmed NoV infections in patients of all ages in Pernambuco state, Northeast Brazil, between 2014 and 2017.

2 | METHODS

2.1 | Study design

This was a transversal study. The samples from this study were collected between January 2014 and December 2017 in Pernambuco state, Brazil. Pernambuco belongs to the Northeast region and has a total area of 98 146 315 km². The state is divided into 184 cities and the district of Fernando de Noronha. Pernambuco is characterized by two types of climate: humid tropical, predominant in the coast, and semiarid, which is found inland. The state population is approximately 9 276 million people.²⁷

A total of 1135 stool samples from AGE cases were received at the Pernambuco State Central Laboratory, which is the state reference laboratory for AGE. All patient information was registered on the online laboratory system and their stool samples were tested for the presence of NoV as described in Section 2.3.

2.2 | Ethical statement

This study adhered strictly to all ethical procedures required by the Brazilian National Health Council (CNS) Resolution 466/2012 and was approved by the Aggeu Magalhães Institute (IAM) Research Ethics Committee (CAEE: 924777/18 3.0000 5190). Patients had no

harm to this study. The anonymity of the individuals involved in the study was guaranteed.

2.3 | NoV detection

Samples were tested for the presence of NoV using the qualitative EIA RIDASCREEN Norovirus 3rd Generation (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's recommendations. The test is a sandwich solid phase EIA for the detection of genogroup GI (GI.1, GI.2, GI.3, GI.4, GI.7) and GII (GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.5, GII.6, GII.7, GII.8, GII.10, GII.12, GII.13, GII.14, GII.17) NoV in stool samples. Briefly, 96-well microplates were coated with a mixture of GI and GII NoV-specific monoclonal antibodies. An aliquot of fecal suspension was added to the microwell together with biotinylated monoclonal NoV antibodies. After five washes with 300 µL of Wash Buffer washing, 100 µL of streptavidin peroxidase conjugate was added and incubated for 30 minutes at room temperature. The plates were washed and 100 µL of the substrate was added and incubated for 15 minutes incubation at room temperature. The reaction was stopped and the presence of NoV was detected colorimetrically at 450 nm using a spectrophotometer.

2.4 | Patients characterization

Since 2012, the acute diarrhoeal syndrome is a compulsorily notifiable disease in Pernambuco. For notification, health professionals must fill out a notification form, register in the Notification of Injury Information System (SINAN) and notify sentinel units of the state health department. The notification form includes several variables such as date of birth, sex, county of residence, rotavirus vaccination status and patient signs and symptoms. Demographic, epidemiologic, and clinical information were retrieved from SINAN and analyzed.

2.5 | Molecular characterization of NoV strains

Twenty positive samples were selected for sequencing. Viral RNA was extracted from 140 µL of fecal suspension using the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, CA) according to the manufacturer's instructions. The RNA was eluted in 60 µL buffer AVE. RNA was then reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA) using the ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) and a mix of three primers: COG2R²¹, 15 R (TCAGCAGGGGAAAAGCCGCC, this study), and commercial random primers provided in the ImProm-II kit.

cDNA was after amplified using GoTaq Green Master Mix (Promega) and 10 µM of primers 11 F (AGTGGAAATTCATCGCC CACTGG) and 11 R (GGCTTGGACAAAATTTGTTCTAATCCAGGG) which target a 786 bp region in the ORF1-ORF2 junction. Amplified products were purified with QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), as described in the manufacturer's protocol. Samples were sequenced with Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (v3.1) in the ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using primers 11 F and 11 R. The consensus sequence were aligned and edited with the SeqMan software (DNASTAR, 5.0).

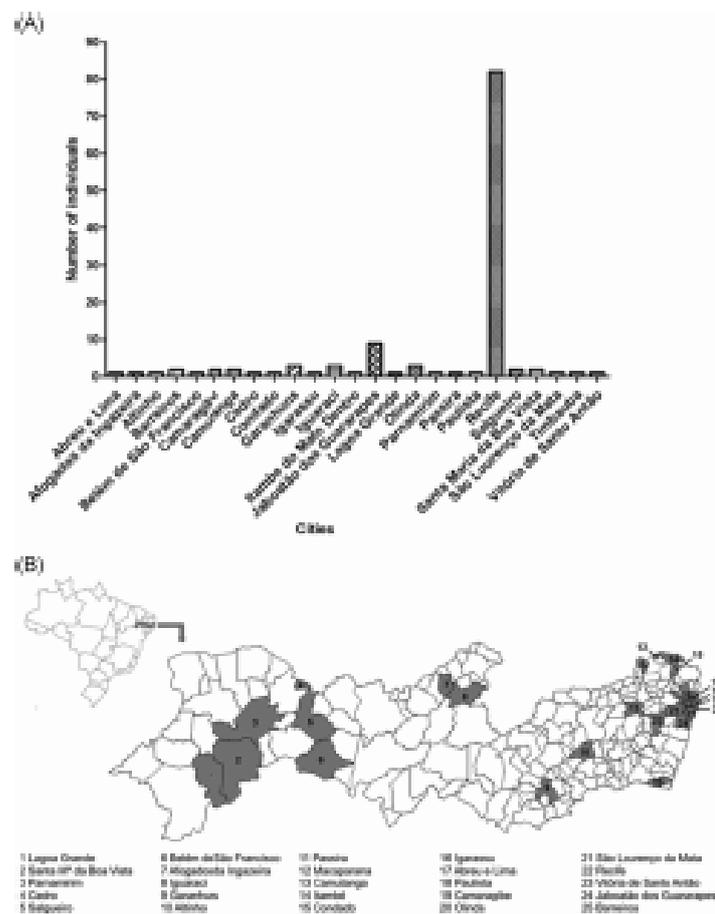


FIGURE 1 Study location. A, Map showing the location of the positive NoV samples in Pernambuco, state Brazil. B, Distribution of NoV-associated gastroenteritis in Pernambuco counties. NoV, Norovirus

isogenic package. WIL Genotyping was performed using the Norovirus Typing Tool Version 2.0²³ and phylogenetic analyses. The phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood method and Tamura-Nei model using the MEGA X software with bootstrap tests (1000 replicates).^{23,24} The tree was further edited using iTOL Tree (itolamblodn). NoV GI strain NoV/Hu/GI.2/BRAZIL/2015 was used as an outgroup.

2.6 | Statistical analysis

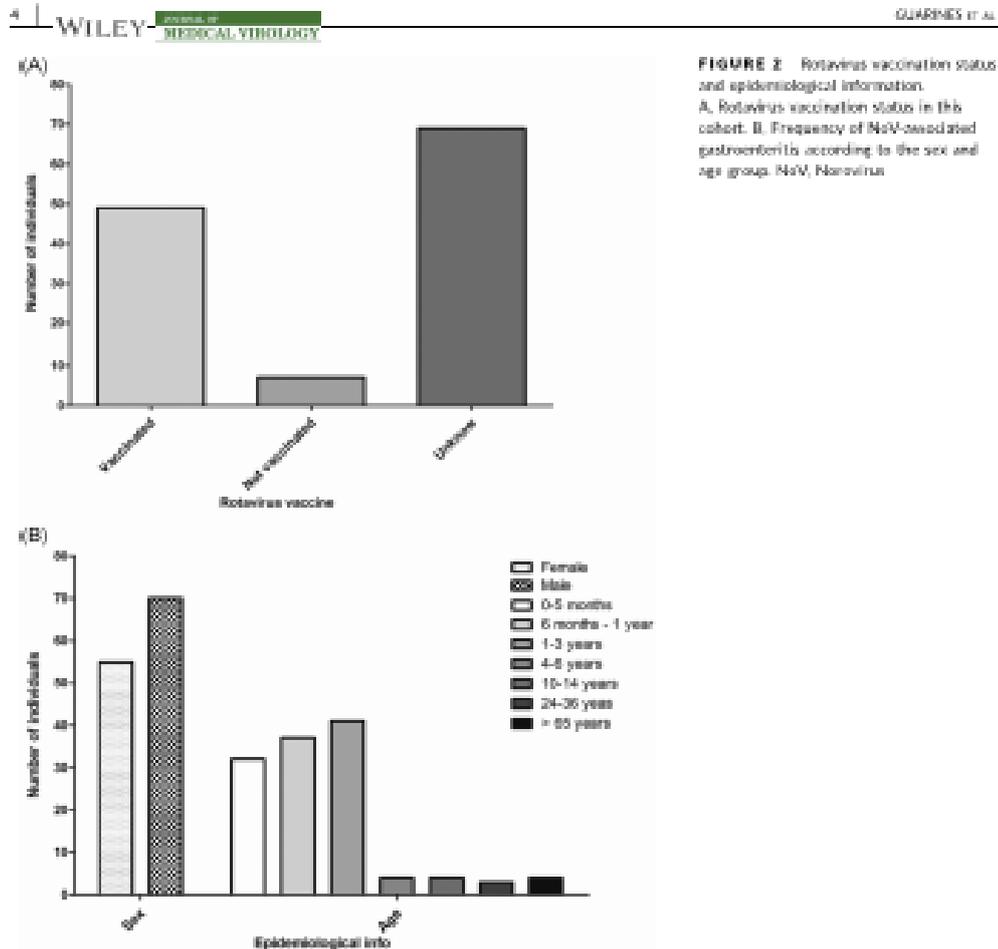
All graphs and statistical analyses were performed using the GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA) and the IBM SPSS Statistics 22.0 (Armonk, NY) software. A two-way analysis of variance was carried out using the factors year

and season to analyze the temporal distribution of NoV cases. Statistically significant differences were defined as $P < .05$.

3 | RESULTS

3.1 | Study population

From January 2014 to December 2017, a total of 1135 fecal samples of patients with AGE were collected in 105 cities in the Pernambuco state and tested for the presence of NoV antigen using the commercially available RIDASCREEN Norovirus EIA kit. Of the total, 125 (11.01%) samples were found positive for NoV. Completely filled notification forms were obtained from 88 out of 125 (70.40%) NoV-positive patients.



Sample cases from several cities in the Pernambuco state (Figure 1), but the majority was from the state capital Recife (65.60%), which is the largest city in the state, followed by Jaboatão dos Guararapes (7.20%) (Figure 1).

3.2 | Patients epidemiological and clinical features

Out of 125 NoV-positive patients, 49 (39.20%) had been vaccinated against rotavirus and 7 (5.60%) were not. Sixty-nine patients (55.20%) had a vaccination status unknown for rotavirus (Figure 2A).

Among the patients studied, 55 (44.00%) were female and 70 (56.00%) male. Their ages ranged from 5 days to 87 years (median 0.92 years), and the group most affected by NoV infection (68.00%) was children under 3 years (Figure 2B).

Complete clinical information was available for 88 out of 125 NoV-positive patients. Table 1 summarizes the clinical information of

the patients. All of them had diarrhea, which is the main symptom that leads individuals to seek the health system. Diarrhea lasted from 1 to 11 days, with a mean duration of 3.64 days.

The majority of patients had vomit episodes (n=60; 68.60%), which lasted 1 to 11 days (mean 2.39 days). Fever was detected in 52.20% (46 out of 88) of the patients with temperatures ranging from 37.90°C to 39.90°C (mean 38.20°C) and nine patients (10.22%) had bloody stools. Combined symptoms of diarrhea, vomiting, bloody stools, and fever were found in only three patients (3.40%), whereas diarrhea, vomiting, and fever were found in 43.18% of patients. No fatal cases were detected in the studied population.

3.3 | Temporal distribution

Most NoV-positive cases were in the 2015 and 2016 years. Regarding the season, NoV was detected throughout the year, but we observed a

TABLE 1 Clinical symptoms of NoV-associated diarrhea in Pernambuco, Brazil^a

Symptoms	Number of patients	% Total (95)
Diarrhea ^b	88	100
Vomiting ^b	60	68.18
Fever ^b	46	52.27
Bloody stools ^b	9	10.22
Diarrhea, vomiting, bloody stools, and fever	3	3.41
Diarrhea and vomiting	60	68.18
Diarrhea and bloody stools	9	10.22
Diarrhea and fever	46	52.27
Diarrhea, vomiting, and bloody stools	5	5.68
Diarrhea, vomiting, and fever	38	43.18
Vomiting, bloody stools, and fever	3	3.41
Vomiting and bloody stools	5	5.68
Bloody stools and fever	7	7.95

^aComplete clinical information was obtained for 88 out of 125 NoV-positive patients.

^bSymptom alone or in any combination.

higher number of cases in the summer-autumn seasons, corresponding to the months December to June (Figure 3). The differences in the year and season distribution were statistically significant ($P = 0.015$ and $P = 0.066$ for year and season effect, respectively).

3.4 | Genetic variability of NoV strains

We sequenced the ORF1-ORF2 region of 20 NoV strains circulating in Pernambuco state (GenBank accession numbers

TABLE 2 NoV genotypes detected in this study

Reference	Capid ^b	N (95)
GI1Pc	GI14	16 (80)
GI1P16	GI14 ^c	2 (10)
GI1P16	GI13	1 (5)
GI1P4 ^c	GI14	1 (5)
Total		20 (100)

Abbreviation: NoV, Norovirus.

^aSydney_2012.

^bDen_Hong_2006b.

MN416493-MN416512) and genotyping was done by both the Norovirus Typing Tool and phylogenetic analyses (Table 2 and Figure 4). Genotype designation was based on polymerase and capsid regions, as previously described.²³ Reference full-length NoV genome sequences ($n = 34$) were retrieved from GenBank for the analysis.

Four different norovirus GI1 genotypes were found: GI1Pc-GI14, $n = 16$; GI1P16-GI13, $n = 1$; GI1P16-GI14, $n = 2$; GI1P4-GI14, $n = 1$ (Table 2).

4 | DISCUSSION

NoV is the main etiological agent of AGE in the world. These viruses account for approximately 95% of all viral AGE outbreaks and over 50% of all outbreaks worldwide.²⁶ In the United States, for example, 21 million people are infected by NoV every year. Most NoV cases are seen in children, which is the most vulnerable age group.²⁶ Globally, NoV causes a total of \$4.2 billion in direct costs for the health systems per year.²⁷ The virus is distributed all over the world. The prevalence rate of NoV has varied from 4.23% to 53.4%.^{18,27}

Data on NoV epidemiology among all ages in community settings are limited, especially in the tropical area of the world. In Brazil, a

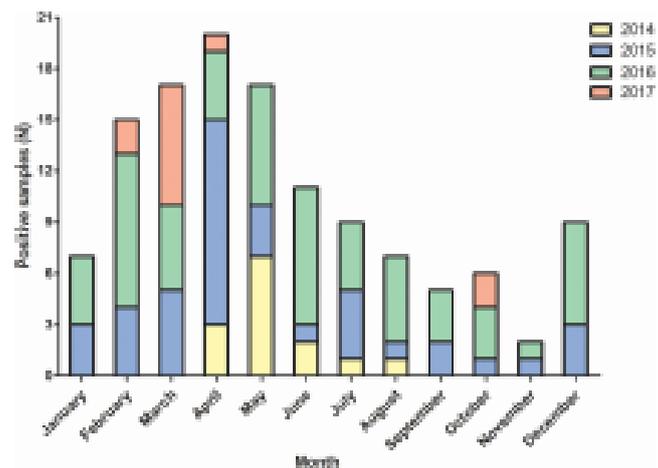


FIGURE 3 Seasonality pattern of NoV-associated gastroenteritis over a period of 4-year period in Pernambuco, Brazil. The differences were statistically significant (two-way analysis of variance). NoV, Norovirus

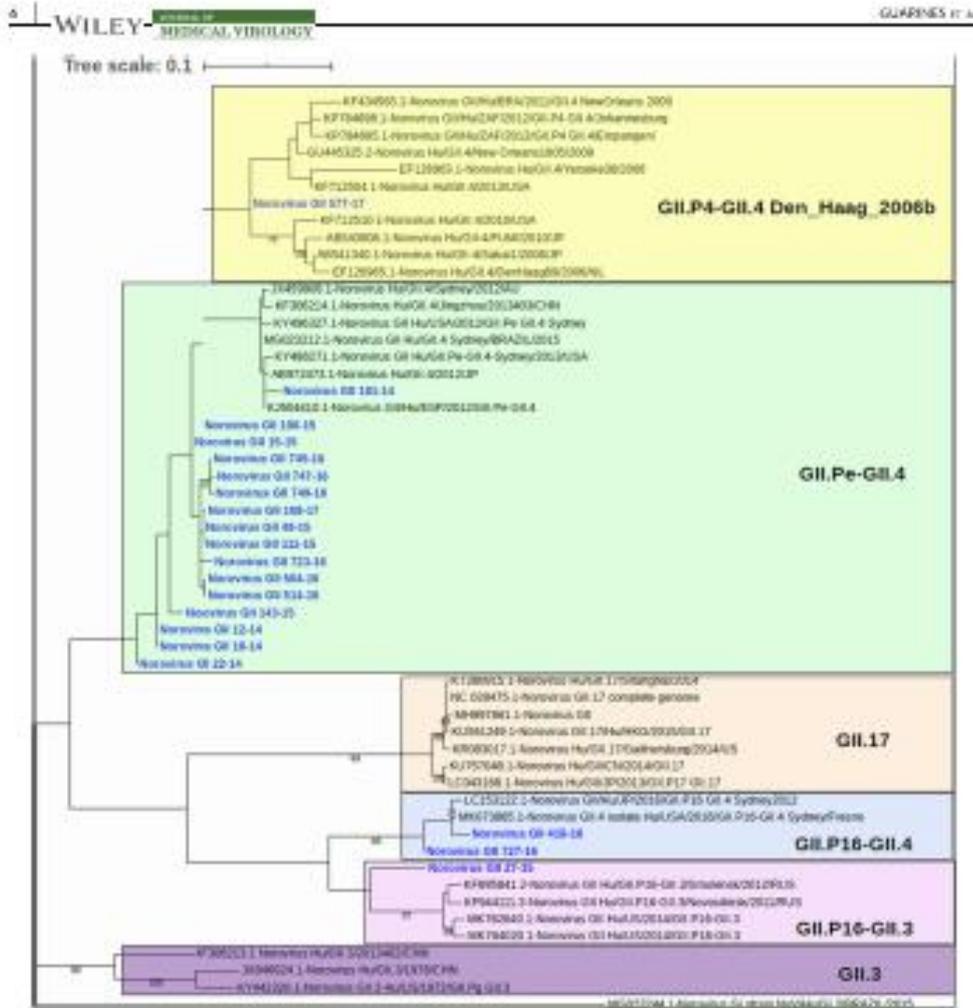


FIGURE 4 Phylogenetic tree of NoV strains circulating in Brazil. Novel NoV GII strains characterized in this study (n = 20) are indicated in blue. Genotypes are highlighted in different colored rectangles. Reference strains were downloaded from GenBank. Maximum likelihood phylogenetic tree was constructed based on the sequence from the ORF3-ORF2 junction with MEGA X software with bootstrap tests (1000 replicates), and edited on ITCO. Tree [https://itcolab.de/]. The bootstrap percentage values of >75% are shown at each branch point. NoV GI (Accession number MG023244) was used as an outgroup. NoV, Norovirus

few epidemiological studies have been made and NoV detection rate in AGE cases has been very variable. Some surveys observed a detection rate above 30%, such as 33.4% in Rio de Janeiro state,²⁰ 35.2% in Amazon,¹⁷ 35.4% in Pará.²¹ Other studies reported incidence under 30% in the country, such as one that reported 8% in Paraná state,²² 11.3% in Espírito Santo,¹⁸ 12.3% in Acre,²³ 17.6% in Maranhão,²⁵ and 19.6% in Sergipe.²⁴ A single study was conducted between May 2004 and April 2005 in Recife, Pernambuco capital. It

that research, Nakagomi et al.²⁴ detected NoV in 15% of AGE cases in children less than 5 years of age. In our study, which analyzed data from children and adults collected in several cities from Pernambuco state, we detected NoV in 11.01% of patients of all ages with AGE.

Rotavirus vaccination introduction has successfully reduced the number of cases and mortality due to that virus. However, the reduction of rotavirus cases has made NoV to gain more prominence in AGE cases.²⁶ In addition, large-scale rotavirus immunization has

prompted the need for implementation of surveillance programs for other viral pathogens associated with diarrheal diseases.²² Studies in Brazil showed that NoV incidence is higher than rotavirus, proving the importance reached by NoV.^{26,28} In our study, most patients (55.20%) with detectable NoV had unknown rotavirus vaccine status and 39.20% were vaccinated against rotavirus.

Regarding sex distribution, we found 44.00% of female patients and 56.00% of males in this cohort. Differences in NoV infection rates between males and females is not usually observed.²⁵ Harris *et al.*²⁴ described a slightly higher number of female participants in their study (52.83%) and a statistically significant difference was observed only when the data were stratified by age group, with twice as many males compared with females in the youngest age group (0–4 years). Rakoni *et al.*²⁷ observed no significant differences for age and sex in patients infected or not with an enteric virus, although they observed a trend with infection occurring in younger children.

Although NoV occurs in people of all ages, a substantially higher incidence is observed in infants and children under 5 years of age.^{17,27} Other studies conducted in Brazil have found a similar NoV age distribution pattern.^{24,28} In this study, 88.00% of the affected patients were under 3 years old, corroborating with literature data. The increased incidence of NoV infection in children may be due to lack of anti-NoV immunity, improper personal hygiene habits gave their young age and frequent contact with other children and asymptomatic adult carriers.¹⁸

NoV gastroenteritis is usually self-resolving, but severe cases and deaths can occur, especially in people living in developing countries.²⁹ The main symptoms reported in NoV infections are diarrhea, fever, vomiting and nonbloody stool.^{23,40} In our study, 68.68% of our patients presented vomit episodes, with a mean duration of 2.39 days, and 52.27% had a low-grade fever (mean body temperature of 38.20°C). All of our patients had diarrhea, with a mean duration of 3.04 days. The majority of the patients (89.77%) had nonbloody stool, which is in agreement with the literature data. In a study in the United Kingdom, patients had diarrhea and vomiting episodes lasting on average 2.8 and 1.7 days, respectively.²⁸

NoV has been known as winter vomit disease as the disease is more frequent during winter and spring seasons in temperate regions.⁴¹ The reasons for this phenomenon are poorly understood, but it may be related to behavioral, biological, environmental factors that influence transmission efficacy in human populations.⁴² The seasonality pattern of NoV in the tropics is poorly described.²⁴ In Latin America, countries have a great diversity in the climate, ecosystem and demography.⁴³ This is the case of Brazil, a continental country. Santos *et al.*²⁵ observed NoV infections year long, with no specific seasonal distribution. Despite the higher detection rate in the autumn and winter, other authors could not establish a seasonal pattern.¹² Other study showed a higher incidence of NoV infection in the summer, but they highlighted the controversy about seasonality in Brazil.¹⁴ Here, we observed a trend in the increase in the number of cases in autumn and summer and this difference was statistically

significant during the 4 years of the study. This agrees with literature data on NoV seasonal distribution in the tropics.^{44,45} However, the incidence of NoV throughout the year suggests a continuing potential for illness in this region of the country.

Currently, there is no active surveillance on NoV in Latin America and all data comes from epidemiological studies performed in the field.⁴² Here, we showed that this virus continues to circulate year-round and is responsible for a significant number of AGE cases, especially in young children. Our work established the frequency of NoV-associated AGE and characterized the clinical and epidemiological profile of patients in a long study period, thus contributing to fill a gap in the NoV-associated gastroenteritis in the tropics.

NoV features a high degree of genetic diversity and molecular surveillance is very important to characterize the circulating genotypes in a given area. This information has an impact on the diagnostics of NoV infections and also paves the way for vaccine development. Thus, we performed the genetic characterization of 20 NoV strains obtained from these patients by sequencing the ORF1-ORF2 junction. In some studies, genotyping is performed using only the viral capsid region, which makes the identification of recombinant strains difficult. Because of that, dual-typing nomenclature has been proposed.^{23,46} Four different norovirus GI genotypes were found (GI:Pe-GII:4; GI:Pi6-GII:3; GI:Pi6-GII:4; GI:Pi4-GII:6). The most prevalent genotype detected in our region was GI:Pe-GII:4. This genotype is common in other countries and also in Brazil.^{36,47} In Brazil, NoV GI:4 has been the most detectable genotype for a long time, including variants New Orleans_2009 and Sydney_2012.⁴⁴ However, the pattern of circulation of recombinant strains, such as GI:Pi6-GII:4 Sydney (n = 2 in our study) is changing and this kind of recombination is being more commonly described. The GI:Pi6 polymerase is becoming very detectable and many recombinants have been found.^{46,48} Besides GI:Pi6-GII:4, we also found one strain GI:Pi6-GII:3 and one GI:Pi4-GII:4 (Den., Haag_2006b) strain, suggesting that genetically diverse NoV strains are circulating in this region.

Therefore, our study provided important information about the demographics, clinics and molecular epidemiology of NoV infection in tropical settings and will assist health officials and clinicians to develop better control and management strategies against this important pathogen.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Viral Diarrhea Unit at the Department of Virology of Pernambuco State Central Laboratory (LACEN/PE) for providing the samples and epidemiological data. We would like to thank Dr. Marisa Mlagostovich (Dewaldo Cruz Foundation-FIOCRUZ/RJ) for gently providing the positive NoV controls. This study was supported by the Foundation for Science and Technology of Pernambuco (FACEPE-APQ-03422/12-15). KMG and RPGM are recipients of a doctoral and master fellowship, respectively, from CAPES.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KMG and RPCM did the experiments, analyzed the data and wrote the paper. JJFM helped in the study design and data analysis. LJP conceived the research, designed the experiments, analyzed the data and wrote the paper.

ORCID

Anderson Faria  <http://orcid.org/0000-0003-1134-5659>

REFERENCES

1. WHO 2016. Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiology of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(11):1211-1228.
2. Lopman BA, Steele D, Kirovood CD, Parashar UD. The vast and varied global burden of norovirus: prospects for prevention and control. *PLoS Med.* 2016;13(4):e1001939.
3. O'Ryan M, Kura-Morales M, Lopman B. Norovirus in Latin America: systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J.* 2017; 36(2):127-134.
4. Ludwig-Begall LF, Mauray A, Thiry E. Norovirus recombinants: movement in the field, recalcitrant in the lab—a scoping review of recombination and recombinant types of noroviruses. *J Gen Virol.* 2018;99(9):970-988.
5. Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol.* 2015;100:1393-5404.
6. Petronella N, Roehain J, Suresh N, et al. Genetic characterization of norovirus GII.6 variants circulating in Canada using a metagenomic technique. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):521.
7. Chan MCW, Hu Y, Chen H, et al. Global Spread of Norovirus GII.17. *Kwongki 308.* 2014-2016. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(8):1359-1354.
8. Patel NM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinje J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1224-1231.
9. Koblížek E, Dvořák S, Plesky BA. Norovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):134-364.
10. Lopman B. Global Burden of Norovirus and Prospects for Vaccine Development. 2015. <https://www.cdc.gov/norovirus/downloads/global-burden-report.pdf>. Accessed 02 Jan 2018. 2018.
11. Ravello W, D'Saia DH, Sanchez G. Norovirus: the burden of the unknown. *Adv Food Microb Res.* 2018;86:13-55.
12. de Andrade Jda S, Rocha MS, Carneiro-Costa FA, et al. Norovirus associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. *J Clin Virol.* 2014; 61(10):345-352.
13. Ferreira MSR, Xavier MPTP, Farias TM, et al. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. *J Med Virol.* 2008;80(2):338-344.
14. Nakagomi T, Corneia JB, Nakagomi O, et al. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol.* 2008;153(9):957-960.
15. Ribeiro LR, Gáberri RSO, Barreira DMPG, et al. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo, Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(2):201-206.
16. Bitencourt ELR, Siqueira JAM, Medeiros TB, et al. Epidemiological and molecular investigation of norovirus and astrovirus infections in Rio Branco, Acre, Northern Brazil: a retrospective study. *J Med Virol.* 2019;91:997-1007.
17. Costa STP, Furlan TM, Lima JCG, et al. High prevalence of norovirus in children with sporadic acute gastroenteritis in Manaus, Amazon Region, northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(6):391-395.
18. Pratte-Santos R, Magostovich MP, Furlan TM, et al. High prevalence of enteric viruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in a low-income area in Vitória, Southeastern Brazil. *J Med Virol.* 2019;91:744-750.
19. Kamioka OA, Malafieiro G, Pavanello EI, Sousa SCZ, Bassil NP, Sato APS. Norovirus in São Paulo city, Brazil, 2010-2016: a cross-sectional study of the leading cause of gastroenteritis in children. *Epidemiol Serv Saude.* 2019;28(2):2018290.
20. SES. Perfil Socioeconômico, Demográfico e Epidemiológico. Pernambuco 2016. 2ª Ed. Recife: Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. 2016:2016:238.
21. Kageyama T, Kajino S, Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norovirus-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1540-1557.
22. Kremerman A, Yessens H, Deforche K, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol.* 2011;50(2):123-125.
23. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993;10(2):512-526.
24. Kainer S, Stecher G, Li M, Krystal C, Tamura K, MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547-1549.
25. Kremerman A, Yuga E, Yessens H, et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol.* 2012;158(10):2059-2068.
26. Kant SM. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses.* 2010;2(8):748-781.
27. Bartoch SM, Lopman BA, Otazo S, Hall AJ, Lee BY. Global economic burden of norovirus gastroenteritis. *PLoS One.* 2016;11(4):e0151219.
28. Chan C, Yan JB, Wang HL, et al. Molecular epidemiology and spatiotemporal dynamics of norovirus associated with sporadic acute gastroenteritis during 2013-2017, Zhoushan Islands, China. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200911.
29. Braggink LD, Triantafyllou MU, Marshall JA. The molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Victoria, 2016. *Commun Dis Intell (2018)* 2018;42-42.
30. Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, et al. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *PLoS One.* 2012;7(8):e33754.
31. Siqueira JAM, Uehara AC, Gonçalves MS, et al. Group A rotavirus and norovirus display sharply distinct seasonal profiles in Belém, northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;108(5):643-644.
32. Raboni SM, Danuso GAC, Ferreira CE, et al. Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalized children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(4):428-435.
33. Portil TM, Siqueira JAM, Costa LCPN, et al. Caliciviruses in hospitalized children, São Luís, Maranhão, 1997-1999: detection of norovirus GII.12. *Braz J Microbiol.* 2016;47(3):724-730.

34. Santos VS, Gargel RQ, Casalciano SMH, et al. Acute norovirus gastroenteritis in children in a highly rotavirus vaccinated population in Northeast Brazil. *J Clin Virol*. 2017;88:33-38.
35. Hebbelstrup Jensen B, Jokelainen P, Nielsen ACY, et al. Children attending day care centers are a year-round reservoir of gastro-intestinal viruses. *Sci Rep*. 2019;9(1):3286.
36. Harris JP, Izaniza-Gonara M, Allen DJ, Kelly S, O'Brien SI. Norovirus strain types found within the second infectious intestinal diseases (IID2) study on analysis of norovirus circulating in the community. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):87.
37. Berkhoff M, Anselo WC, Estévez A, et al. Incidence and clinical profile of norovirus disease in Guatemala, 2008-2013. *Clin Infect Dis*. 2018;67(2):420-436.
38. Paula FL, Sardi SI, Tigue DM, Fernandes FMC, Campos GG. Acute gastroenteritis associated with Norovirus G6.4 Variants. *Am J Gastroenterol*. 2018;55(3):264-266.
39. Shah MP, Hall AJ. Norovirus illnesses in children and adolescents. *Infect Dis Clin North Am*. 2018;22(1):105-118.
40. Ku MS, Shou JN, Lin CP, Chao YH, Chen SM. Clinical characteristics and outcomes in norovirus gastroenteritis. *Indian J Pediatr*. 2014; 83(12):1323-1326.
41. Fretz R, Herrmann L, Christen A, et al. Frequency of Norovirus in stool samples from patients with gastroenteral symptoms in Switzerland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24(3):214-216.
42. Rothmans J. Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(6):526-527.
43. da Silva Poló T, Peirão JR, Mendes LCN, et al. Human norovirus infection in Latin America. *J Clin Virol*. 2016;78:115-119.
44. Marshall JA, Hillard ME, Sinclair ME, et al. Incidence and characteristics of endemic Norwalk-like virus associated gastroenteritis. *J Med Virol*. 2003;69(4):568-576.
45. Kreidlik K, Charide R, Dbaibo G, Melkers NM. The epidemiology of Norovirus in the Middle East and North Africa (MENA) region: a systematic review. *Virol J*. 2017;14(1):220.
46. Hernandez JM, Silva LD, Junior ECS, et al. Molecular epidemiology and temporal evolution of norovirus associated with acute gastroenteritis in Acre state, Brazil. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):147.
47. Chachons W, Charoensri J, Wanlapakorn N, Yongsurawat S, Poovorawan Y. Recombinant G1P6-G6.4 Norovirus, Thailand, 2017-2018. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(8):1612-1614.
48. Barreira DMFG, Furlan TM, Tonini MAL, et al. Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus G1P6-G6.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189504.
49. Barclay L, Cannon JL, Wilkove ME, et al. Emerging novel G1P6 Noroviruses associated with multiple capsid genotypes. *Viruses*. 2019;11(4):535.

How to cite this article: Guarines KM, Mendes RPG, de Magalhães JFF, Pena L. Norovirus-associated gastroenteritis, Pernambuco, Northeast Brazil, 2014-2017. *J Med Virol*. 2019;1-9. <https://doi.org/10.1002/jmv.25631>

APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO NA *MICROBIOLOGY RESOURCE ANNOUNCEMENTS*



GENOME SEQUENCES



Partial Genome Sequences of Human Norovirus Strains from Northeast Brazil

Marissa Miranda Guarines,^a Renata Pêssa Germano Mendes,^a Jurandy Júnior Ferraz de Magalhães,^{a,b} Lindomar Pena^a

^aDepartment of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil
^bPernambuco State Central Laboratory (LACEN/PE) Department of Virology, Recife, Pernambuco, Brazil

ABSTRACT Noroviruses are the leading cause of human gastroenteritis worldwide. Here, we sequenced the open reading frame 1 (ORF1)-ORF2 junction region of norovirus strains isolated from 20 human stool samples. Samples were collected between 2014 and 2017 in Pernambuco State, Brazil. Phylogenetic analysis identified four norovirus GI1 genotypes circulating in this area of the country.

Norovirus (NoV) is the main cause of nonbacterial acute gastroenteritis (AGE) worldwide (1). In Latin America, NoV represents 15% of all AGE outbreaks (2). In Brazil, NoV has received greater attention since the introduction of national rotavirus vaccination (3). The virus is highly contagious and spreads mainly by direct contact from person to person (4). The *Norovirus* genus belongs to the *Caliciviridae* family and has a positive single-stranded RNA genome ~7.5 kb long, typically organized in three open reading frames (ORFs). ORF1 encodes nonstructural proteins, including the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), ORF2 encodes the major capsid protein VP1, and ORF3 encodes the minor capsid protein VP2.

NoV can be classified into 10 genogroups (GI through GX) and further subclassified into 49 genotypes based on phylogenetic analysis of the RdRp and the vp7 gene (5). Genogroups GI, GII, and GIV cause disease in humans, and the most commonly detected genotype is GI.4 (6, 7). Here, we report, for the first time, the sequencing and molecular characterization of NoV identified in Pernambuco State, Northeast Brazil. Twenty human stool samples were selected from NoV-positive patients previously diagnosed by Pernambuco State Central Laboratory (LACEN/PE) between 2014 and 2017. The selection of samples for sequencing was based on the year of collection and the quality of amplification seen with agarose gel electrophoresis analysis. Samples were derived from patients who had AGE symptoms, and their ages ranged from 2 months to 2 years.

Viral RNA was extracted from 140 μ l of fecal suspension with the QIAamp viral RNA minikit (Qiagen, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. For sequencing, RNA was first reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using the ImPROM-II reverse transcription system (Promega, USA). cDNA was amplified using GoTaq Green Master Mix (Promega, USA) and the primers 11F (AGTGGAAATTCATGCGCCACTGG) and 11R (GGCTTGACAAAATTTGTTCTAATCCAGGG), targeting a 786-bp region in the ORF1-ORF2 junction. Amplified products were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, USA). Samples were sequenced in both directions with a BigDye direct Sanger sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in the ABI Prism 3730 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Consensus sequences were aligned and edited with the SeqMan DNASTar Lasergene package (DNASTar, WI, USA). The lengths of obtained sequences varied from 315 to 710 bp because of the variable quality of the obtained Sanger reads. Genotyping was performed using the Norovirus Typing Tool version 2.0 (8). Multiple alignments were

Citation Guarines MM, Mendes RP, Ferraz de Magalhães JJ, Pena L. 2020. Partial genome sequences of human norovirus strains from Northeast Brazil. *Microbiol Resour Announc* 9(1):124-129. <https://doi.org/10.1128/MRA.01105-19>.

Editor Jelle Mellema, KU Leuven

Copyright © 2020 Guarines et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Lindomar Pena, lindomar.pena@pqi.fiocruz.br.

Received 10 September 2019

Accepted 21 November 2019

Published 1 January 2020

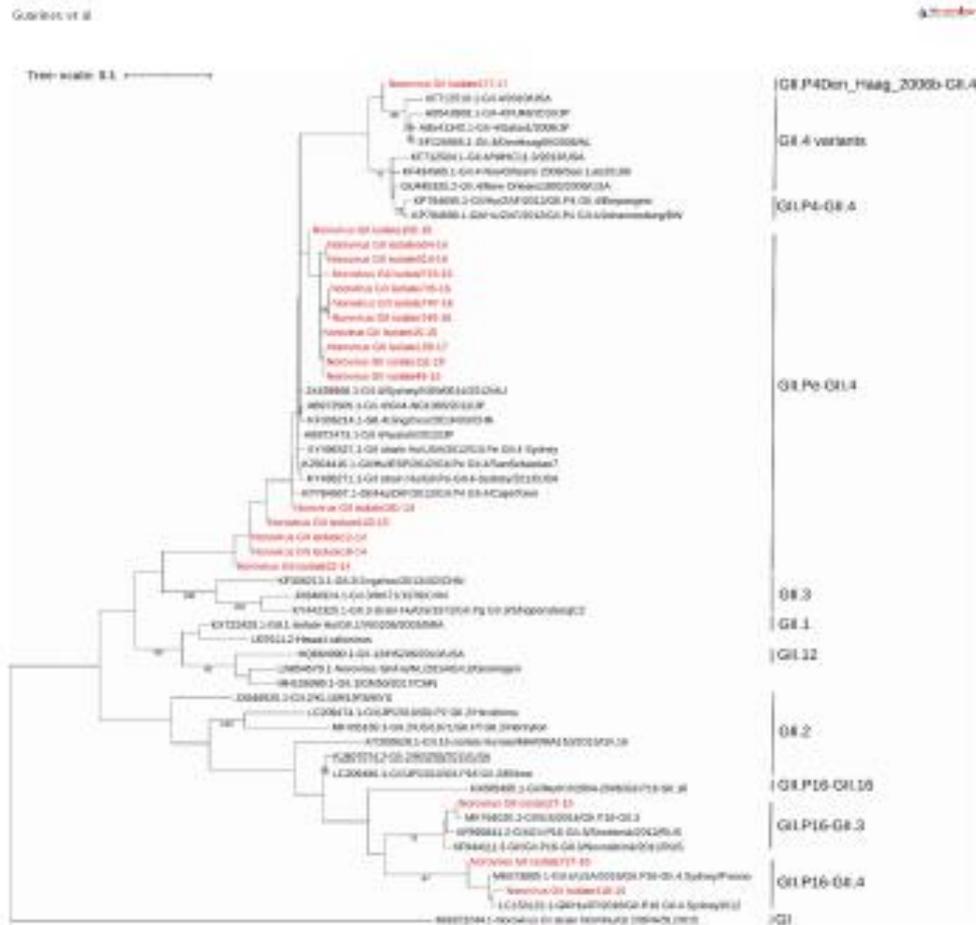


FIG 1 Phylogenetic tree. The novel norovirus GI strains ($n = 20$) isolated in this study are indicated in the phylogenetic analysis in red. Reference strains were downloaded from GenBank. Norovirus GI (accession number M62234) was used as the outgroup. Sequence multiple alignments were performed using the ClustalW algorithm. The maximum likelihood phylogenetic tree was constructed with MEGA 5 software with bootstrap tests (1,000 replicates) and noted as (BS). Tree (<https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-11>). The bootstrap percentage values of $\geq 70\%$ are shown at each branch point.

performed with ClustalW. A phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood method and the Tamura-Nei model using MEGA 5 software with default parameters (5, 10) (Fig. 1).

Four norovirus GI genotypes (GI.16-GI.4, $n = 16$; GI.16-GI.3, $n = 1$; GI.16-GI.4, $n = 2$; GI.16-GI.4, $n = 1$) were found to be circulating in this region of the country. These genotypes were closely related to the following strains: GI.4 strain DenHaag89/2006/NE, GI strain Hu/USA/2012/GI.16-GI.4 Sydney, GI strain US/2014/GI.16-GI.3, and GI strain Hu/BP/2016/GI.16-GI.4 Sydney2016. In summary, our study describes the genetic characterization of 20 NoV strains from Northeast Brazil and sheds light on the molecular epidemiology of NoV in the tropical world.

Data availability. The GenBank accession numbers for the norovirus genome sequences are MN416493 to MN416512.

Microbiology Research Announcement



ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Viral Diarrhea Unit at the Department of Virology of Pernambuco State Central Laboratory (LACENPE) for providing the samples and epidemiological data.

This work was supported by the Foundation for Science and Technology of Pernambuco (FACEPE – APQ-03422.12/15). K.M.G. and R.P.G.M. are recipients of a doctoral and masters fellowship, respectively, from CAPES.

REFERENCES

1. Lopman BA, Steele D, Kirkwood CD, Parashar UD. 2016. The vast and varied global burden of norovirus: prospects for prevention and control. *PLoS Med* 13:e1001999. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001999>.
2. O'Hylan M, Berra-Moreira M, Lopman B. 2017. Norovirus in Latin America: systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J* 36:127–134. <https://doi.org/10.1093/pid/piv606>.
3. Santos VS, Gurgel RQ, Castilheira Sde, Kirby A, Cofe LP, Souto M, Delibéa SS, de Azeiteiro MP, Furlan TM, Miagostovich MR, Carliffe RA, Cuevas LE. 2017. Acute norovirus gastroenteritis in children in a highly rotavirus-vaccinated population in Northeast Brazil. *J Clin Virol* 88:55–58. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.10.015>.
4. Lopman B. 2015. Global burden of norovirus and prospects for vaccine development. CDC Foundation. <https://www.cdc.gov/norovirus/downloads/global-burden-report.pdf>. Accessed 2 January 2018.
5. Chhabra P, de Graaf M, Patel G, Chan MC, Green S, Martella K, Wang Q, White PA, Katayama K, Yamamoto H, Koopmans MPG, Vinje J. 2015. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol* 96:1383–1406. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.081218>.
6. Haneis D, Furlan TM, Teixeira NR, Volpato LPB, Santos RP, Ribeiro ALG, Leite JFG, Souza M, Brasil P, da Cunha DC, Miagostovich MR, Ispazo LC. 2017. Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus G1P[10]-G8.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016. *PLoS One* 12:e0180994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180994>.
7. Li T-F, Hazemba M, Schwank H, Shi T, Wang Z, Yin L, Curry S, Goodfellow IG, Zhou X. 2017. Human norovirus NS3 has RPA, helicase and chaperoning activities. *J Virol* 82:e01606-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01606-17>.
8. Koopmans A, Yamamoto H, DeFonseca E, Assel HFD, Peñaranda S, Oberste ML, Vinje J, Koopmans M. 2013. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol* 51:121–125. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.03.006>.
9. Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10:512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a048223>.
10. Kumar S, Stecher G, Li M, Kryazev C, Tamura K. 2016. MEGA 3. Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 25:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/mwv096>.

ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA DO LACEN

	SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO – SES SECRETARIA EXECUTIVA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA “Dr. Milton Bezerra Sobral” – LACEN PE	 PERNAMBUCO <small>ESTADO DE PERNAMBUCO</small>
<p>Ofício nº 2300/2017</p> <p style="text-align: right;">Recife, 24 de novembro de 2017.</p>		
<p>Prezado Senhor,</p>		
<p>Em atenção a solicitação de Cooperação Técnica do LACEN PE no desenvolvimento do Projeto de Sequenciamento de Nova Geração para Norovírus usando a plataforma MiSeqIllumina, e de acordo com a Gerência de Diagnóstico Laboratorial para Controle e Prevenção de Doenças - GDLCPD e a Coordenação de Diagnósticos de Doenças Virais - CDDV, comunicamos nossa CONCORDÂNCIA.</p>		
<p>Colocamo-nos à disposição para esclarecimentos necessários.</p>		
<p>Atenciosamente,</p>		
<p style="text-align: center;"> Maria José Couto de Oliveira Diretora Geral de Laboratórios Públicos em exercício</p>		
<p>Professor Dr. Lindomar José Pena Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/PE Instituto Aggeu Magalhães - IAM Departamento de Virologia - LAVITE</p> <p>Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE Recife - PE, CEP 50.740-465</p>		
<p style="text-align: center;"><small>Rua João Fernandes Vieira, 5/N – Soledade – Recife/PE – CEP: 50.090-215 Fone: (0xx51) 3181-6410/6417 – Fax: (0xx51) 3181-6303 e-mail: lacen@saude.pe.gov.br</small></p>		

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Título do Projeto: "Caracterização Molecular dos Norovírus Circulantes no Estado de Pernambuco"

Pesquisador responsável: Lindomar José Pena

Instituição onde será realizado o projeto: IAM/Fiocruz

Data de submissão ao CEP: 29/05/2018

Registro no CAAE: 924.777.718.3.0000.5190

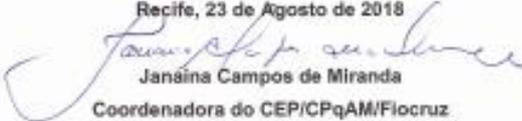
Número do Parecer na Plataforma Brasil: 2.840.085

PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O CEP/CPqAM reforça a necessidade de entrega de relatórios parcial e final, em cumprimento à Resolução CNS 466/12, capítulo XI, artigo 2d.

Recife, 23 de Agosto de 2018



Janaina Campos de Miranda
Coordenadora do CEP/CPqAM/Fiocruz

Centro de UPPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.070-420 Fone: (81) 2101.3030
Fax: (81) 2452.1011 | 2101.2020
Recife - PE - Brasil
comitadseta@cpqam.fiocruz.br

