

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*MARÍA EUGENIA GALEANO DINATALE*

#### **DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE NOROVÍRUS EM CASOS DE GASTRENERITE INFANTIL AGUDA NO DEPARTAMENTO CENTRAL DO PARAGUAI**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Ciências. Área de Concentração:  
Virologia.

**Orientadores:** Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Dra. Marize Pereira Miagostovich

**RIO DE JANEIRO**

**2011**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

D583

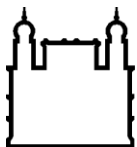
Dinatale, María Eugenia Galeano.

Detecção e caracterização molecular de Norovírus em casos de  
gastroenterite infantil aguda no departamento central do Paraguai. / María  
Eugenia Galeano Dinatale. – Rio de Janeiro, 2011.  
xxi, 88 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular, 2011.  
Bibliografia: f. 70-88

1.Norovírus. 2.Gastroenterite aguda. 3. Crianças. I. Título.

CDD 616.91



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***MARÍA EUGENIA GALEANO DINATALE***

### **DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE NOROVÍRUS EM CASOS DE GASTRENERITE INFANTIL AGUDA NO DEPARTAMENTO CENTRAL DO PARAGUAI**

**ORIENTADORES: Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite**

**Prof. Dra. Marize Pereira Miagostovich**

**Aprovada em: 28 / 02 / 2011**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dra.** Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza – IOC - Fiocruz- Presidente

**Prof. Dra.** Lílíana Cruz Spano – Universidade Federal do Espírito Santo

**Prof. Dra.** Caroline Cordeiro Soares – IOC - Fiocruz

#### **Membros Suplentes:**

**Prof. Dra.** Flávia Barreto dos Santos – IOC - Fiocruz

**Prof. Dra.** Débora Regina Lopes dos Santos - UFRRJ

Rio de Janeiro, 11 de janeiro de 2011

**“Vamos trabalhar sem fazer alarde,  
para pisar com força o chão da cidade.**

**A vida não tem segredo.**

**Quem sentado espera a morte é covarde,  
mas quem faz a sorte é que é de verdade.**

**É só acordar mais cedo”**

***(Canto do trabalhador – João Nogueira)***

### *DEDICATÓRIA*

Aos meus pais, **Augusto Antonio e Eugenia**, e meu irmão **Juan José**, pelo amor e apoio incondicionais, por ter me ensinado a sonhar, pela confiança através dos anos e das loucuras que me propus na vida. Ao meu namorado, **Orlando**, pelo amor, paciência e todos os momentos de tristeza e felicidade que compartilhamos *ao vivo e online*. Obrigada por ter entrado na minha vida e me permitido entrar nas suas.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por caminhar sempre do meu lado e não me abandonar nessa luta.

Ao meu orientador e amigo, Dr. José Paulo Gagliardi Leite pela confiança e apoio e por ter tido sempre um tempinho, apesar das muitas responsabilidades, para me escutar. Obrigada por ter sido amigo, pai e colega em todo momento.

À Dra. Marize Pereira Miagostovich, por ter me aceito entre seus alunos e por ter se preocupado em resolver os pequenos grandes dilemas da minha vida pessoal e científica. Obrigada pela força e carinho Marize!

Aos meus amigos e colegas do LVCA. A Adriana Correa, Alexandre Pina, Anna Carolina Tinga, Ana Pinto, Carmen Baur, Filipe Carvalho-Costa, Flavia Guimaraes, Francisca dos Santos, Irene Araújo, Joeler Vargas, Julia Fioretti, Juliana Bragazzi, Maria da Penha Xavier, Marilda Almeida, Nilson Porto da Gama, Pamela Souza, Rosane Assis, Silvana Rodrigues Portes, Thais Ramos, Thaize Quiroga, Tiago Borsoi.

A Juliana Andrade e Suellem Possas, Mônica Ferreira e Alexandre Fialho, por terem ajudado tanto na minha adaptação ao laboratório e pelos inúmeros conselhos. Sem vocês esse trabalho não teria sido possível.

Aos meus irmãos adotivos: Fernando López Tort, Matias Victoria, Túlio Fumian, Gonzalo Belo, Hugo Resque. Obrigada por terem aguentado e compartilhado tanto e por terem me feito rir quando mais precisei.

Às minhas irmãs de alma e coração: Mariela Martínez, Sabina Victoria, Ludmila Rocha, Marcelle Figueira, Flavia Netto, Sara Ferreira, Lucia Alvarado, Tatiana Rose, Ana Caroline Sá e Ana Carolina Ganime; por ter passado más e boas comigo. Deus lhes abençoe!

Gostaria de agradecer a Sandro Sperandei e Marcos Lima de Mendonça, por terem compartilhado sabedoria no momento preciso. Obrigada por terem me acompanhado sempre e por me guiarem nos momentos difíceis.

Eduardo de Mello Volotão, não tem papel suficiente aqui para te agradecer e eu falo muito, então prefiro resumir bem ao teu estilo: Obrigada por tudo, por fazer parte da minha vida e pela amizade infinita, pelo apoio, carinho e proteção.

À família Rocha por ter sido a minha família carioca. Toda a paz e felicidade para vocês sempre!

A Cynthia Diaz e Júlio Jablonsky, por ter aberto mão dos seus compromissos para me receber no Rio de Janeiro. Obrigada por ter me albergado durante os primeiros meses.

Às famílias Rose, Victoria, Figueira e Secchin Braga, Gonzalo Belo e Maria Jose de Jesus (Zezê) e Cristina Vidal Pessolani por terem emprestado um espaço para mim nos seus lares como uma mais da família. Obrigada mesmo!

A Magaly Martínez, Alberto Amarilla, Emilio Espínola e Gabriel Parra, por terem dado início à minha carreira profissional e me inspirado a continuar na pesquisa. Obrigada pelo apoio, amizade e por todo o trabalho feito juntos.

Aos meus colegas do laboratório de biologia molecular e genética do Instituto de Pesquisa em Ciências da Saúde (IICS). Às Dras. Graciela Russomando e Graciela Velázquez, pelo apoio constante e sinceridade em todo momento.

Aos meus colegas de turma e amigos de todas as pós-graduações, representantes estudantis e professores. Aos funcionários da pós-graduação, especialmente a Daniele Lobato pela orientação e apoio.

À coordenação do curso de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do IOC, Fiocruz.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), CGLAB, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e Universidad Nacional de Asunción (UNA) pelo suporte financeiro deste trabalho.

Às Dras. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza, Liliana Cruz Spano, Caroline Cordeiro Soares, Flávia Barreto dos Santos e Débora Regina Lopes dos Santos por aceitarem participar da banca examinadora desta dissertação.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3CLpro - 3C-like Protease

A – adenina

aa – aminoácido

ABO – grupo A-B-O de histocompatibilidade

Acs – anticorpos

Ags - antígenos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BrEt - Brometo de etídio

CA – Califórnia

Ca<sup>++</sup> - cátion cálcio

CDC - *Center for Disease Control and Prevention*

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

cm<sup>3</sup> – centímetros cúbicos

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

CsCl - cloreto de céσιο

dATP - Desoxiadenosina trifosfato

dCTP - Desoxicitidina trifosfato

dGTP - Desoxiguanosina trifosfato

DINAC - Direção de Meteorologia e Hidrologia

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídio trifosfato

Domínio-P – domínio *Protruding*

Domínio-S – domínio *Shell*

dTTP - Deoxitimidina trifosfato

ECDC – *European Center for Disease Control*



EDTA - ácido etilenodiamino tetracético

EGPA - eletroforese em gel de poliacrilamida

EIA – ensaios imunoenzimáticos

FBVE - *Foodborne Viruses in Europe Net*

FDA - *Food and Drugs Administration*

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

FUT-2 - fucosil transferase 2

g – gramas

*g* – gravidade

G – guanina

GA - gastroenterites agudas

ES – Espírito Santo

GI+ - controle positivo genogrupo I

GII+ - controle positivo genogrupo II

H<sub>2</sub>O – água

HBGA - *Histo-Blood Group Antigens* (antígenos de histocompatibilidade)

HCl - ácido clorídrico

HuCV - calicivírus de humanos

I- inosina

ICTV - *International Committee for Taxonomy of Viruses*

IFN- $\alpha$  - interferon alfa

IFN- $\gamma$  - interferon gama

IgA – imunoglobulina A

IgG - imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IICS - *Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*

IL-2 - interleucina 2

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IRA - infecções respiratórias agudas

kb – kilobases

kDa – kilodaltons

L - litro

LACENs - Laboratórios Centrais de Saúde

LBMG – Laboratório de Biologia Molecular e Genética (Universidade Nacional de Assunção)

LRRR - Laboratório de Referencia Regional de Rotaviroses

LVCA - Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

M – Molar

ME - microscopia eletrônica

mg – miligramas

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

min – minutos

mL – mililitros

mm – milímetros

mM – milimolar

MPL – monofosforil lípido A

MSP-BS - Ministério de Saúde Pública e Bem Estar Social do Paraguai

N - base indefinida

n – número

NaOH – hidróxido de sódio

NB2 - segurança biológica nível 2

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NLV - *Norwalk-like viruses*

nm – nanômetros

NORS - *National Outbreak Reporting System*

NoV – norovírus

NoV pos / neg: positivo / negativo para norovírus

nt – nucleotídeo

N-terminal – extremidade amino terminal

NTPase - nucleosídeo trifosfato hidrolase

°C – graus Celsius

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF - *Open Reading Frame* (fase aberta de leitura)

P.A. – para análise

p22 - proteína de 22 kDa

p48 - proteína de 48 kDa

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia pela polimerase

pd[N]6 – iniciador randômico

PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde.

pH – potencial hidrogeniônico

pmoles – picomoles

poli A ou (A)<sub>n</sub> – cauda poliadenilada

qRT-PCR - transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase, quantitativa

q.s.p. – quantidade suficiente para

R - purina (A/G)

RdRp - RNA polimerase RNA dependente

RNA – ácido ribonucléico

RT – transcriptase reversa

RT-PCR - transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase

RV-A – rotavírus grupo A

S – bases C/G

SaV - Sapovirus

SiO<sub>2</sub> - dióxido de silício

ssRNA – ácido ribonucléico fita simples

subdomínios P1 – subdomínio *Protruding 1*

subdomínios P2 – subdomínio *Protruding 2*

T – timina

TBE - tris-borato-EDTA

TRIS – Tris - hidroximetil- aminometano

TRO - soluções de re-hidratação oral

TTR - mecanismo de tradução, terminação e reinício

UE - União Européia

UNA - Universidade Nacional de Assunção

USA – *United States of America*

UV – luz ultravioleta

V - volts

VLPs - *Virus Like Particles*

VP – *Viral Protein* (proteína estrutural)

VPg - proteína viral de ligação ao genoma

Y - pirimidina (C/T)

μL – microlitros

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Filogenia da família *Caliciviridae*.

**Figura 2:** Classificação dos *Norovirus*.

**Figura 3:** Micrografia eletrônica dos norovírus.

**Figura 4:** Representações da estrutura do capsídeo viral dos norovírus (VLP NoV).

**Figura 5:** Representação esquemática da organização genômica dos norovírus.

**Figura 6:** Principais vias de transmissão dos *Norovirus*.

**Figura 7:** Representação esquemática do genoma dos norovírus com as localizações das regiões mais utilizadas para a amplificação genômica.

**Figura 8:** Fluxograma de procedimentos para detecção e caracterização molecular de norovírus em amostras fecais de crianças em Assunção, Paraguai.

**Figura 9:** Produtos gerados pela amplificação parcial do gene da RNA polimerase RNA dependente por transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase.

**Figura 10:** Distribuição por grupo etário de casos de infecção por norovírus e rotavírus A em crianças com gastroenterite aguda, Assunção, Paraguai.

**Figura 11:** Percentual acumulado das infecções causadas por norovírus e rotavírus A distribuídas por grupo etário.

**Figura 12:** Distribuição mensal de casos de gastroenterite aguda por norovírus em crianças de Assunção, Paraguai

**Figura 13:** Distribuição mensal de casos de gastroenterite aguda por norovírus e rotavírus grupo A em crianças de Assunção, Paraguai.

**Figura 14:** Distribuição mensal de casos de gastroenterite aguda por norovírus em crianças de Assunção, Paraguai e valores médios de temperatura, umidade relativa do ar e de precipitação no município de Assunção, Paraguai, durante os anos 2004 e 2008.

**Figura 15:** Gel de agarose com os produtos amplificados do gene que codifica para a proteína VP1 dos norovirus de diferentes genogrupos.

**Figura 16:** Distribuição mensal e frequências anuais e total dos genótipos de norovírus detectados em Assunção, Paraguai nos anos 2004 - 2005.

**Figura 17:** Relações filogenéticas baseadas na região D do gene da VP1 mostrando as estirpes paraguaias e os protótipos de NoV.

**Figura 18:** Relações filogenéticas baseadas na região D do gene da VP1 mostrando as estirpes paraguaias e os protótipos do GI de NoV.

**Figura 19:** Relações filogenéticas baseadas na região D do gene da VP1 mostrando as estirpes paraguaias e os protótipos do GII de NoV.

## **LISTA DE QUADROS**

**Quadro 1:** Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa (RT) para a obtenção de cDNA de norovírus a partir do RNA viral extraído.

**Quadro 2:** Iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase para amplificação do genoma de norovírus humano.

**Quadro 3:** Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação do gene que codifica a RdRp do norovírus.

**Quadro 4:** Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação do gene que codifica para a proteína do capsídeo (VP1).

**Quadro 5:** Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a pré-amplificação da Região B do gene RdRp.

**Quadro 6:** Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação da Região B do gene RdRp.

**Quadro 7:** Reagentes utilizados na reação de sequenciamento.

**Quadro 8:** Protótipos de norovirus de humanos resgatados do *GenBank* utilizados neste estudo.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Distribuição por ano das infecções por norovírus, detectados pela reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa, em crianças paraguaias <5 anos.

**Tabela 2:** Distribuição por grupo etário e sexo dos casos de infecções por norovírus em crianças paraguaias com gastroenterite aguda.

**Tabela 3:** Distribuição por ano de estudo das amostras positivas para norovírus e genogrupos I e II, segundo o protocolo de amplificação genômica utilizado para a classificação.

**Tabela 4:** Genótipos de norovírus detectados em Assunção, Paraguai dos anos 2004 - 2005.

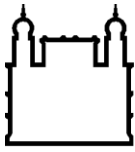


## ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	viii
LISTA DE QUADROS .....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xvi
RESUMO .....	xx
ABSTRACT .....	xxi
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. As gastroenterites.....	1
1.2. Os norovirus.....	1
1.2.1. Histórico .....	1
1.2.2. Classificação .....	2
1.2.3. Morfologia e Características Biológicas.....	5
1.2.4. Genoma e proteínas virais .....	8
1.2.5. Transcrição e Replicação.....	10
1.3. Transmissão .....	11
1.4. Patogênese e Manifestações Clínicas .....	12
1.5. Epidemiologia .....	13
1.6. Detecção e Diagnóstico laboratorial .....	17
1.7. Imunidade contra Norovirus e susceptibilidade à infecção. ....	20
1.8. Tratamento .....	21
1.9. Prevenção e Controle .....	22
1.10. Vigilância Epidemiológica .....	23
2. RELEVÂNCIA .....	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo Geral.....	26
3.2. Objetivos Específicos .....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	27

4.1. MATERIAL.....	27
4.1.1. Amostras Clínicas.....	27
4.1.2. Amostras Controle.....	27
4.1.3. Soluções.....	28
4.1.3.1. Tampão TRIS/HCl/Ca <sup>++</sup> 0,01 M pH 7,2 .....	28
4.1.3.2. Sílica.....	28
4.1.3.3. EDTA [0,2 M] pH 8,0 .....	28
4.1.3.4. Tris-HCl [0,1 M] pH 6,4.....	29
4.1.3.5. Tampão L6.....	29
4.1.3.6. Tampão L2.....	29
4.1.3.7. Tampão tris-boro-EDTA 10X pH 8,4 (TBE) .....	29
4.1.3.8. Gel de agarose a 2% .....	30
4.1.3.9. Solução de brometo de etídio .....	30
4.1.3.10. Etanol 75% .....	30
4.1.4. Materiais para amplificação dos ácidos nucleicos.....	30
4.2. MÉTODOS .....	31
4.2.1. Suspensão Fecal.....	32
4.2.2. Extração do RNA Viral .....	33
4.2.3. Reação de transcrição reversa para obtenção de cDNA .....	33
4.2.4. Detecção molecular de norovirus pela técnica de reação em cadeia pela polimerase. ....	35
4.2.5. Determinação dos genogrupos de Norovirus pela reação em cadeia pela polimerase (PCR - região D).....	36
4.2.6. Determinação dos genogrupos de Norovirus pela reação em cadeia pela polimerase (PCR - região B) .....	37
4.2.6.1. Pré-amplificação da região B .....	37
4.2.6.2. Amplificação da Região B da RdRp. ....	38
4.2.7. Análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose .....	39

4.2.8.	Sequenciamento parcial do genoma viral.....	39
4.2.9.	Análise das seqüências. ....	40
5.	RESULTADOS.....	43
5.1.	Detecção de norovírus pela reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa. ....	43
5.2.	Distribuição mensal das infecções por norovírus de humanos (NoV).....	46
5.3.	Caracterização molecular dos norovírus detectados: determinação de genogrupos e genótipos. ....	51
6.	DISCUSSÃO.....	59
7.	CONCLUSÕES.....	68
8.	PERSPECTIVAS .....	69
9.	BIBLIOGRAFIA.....	70



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

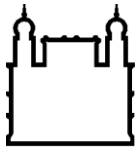
### DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE NOROVÍRUS EM CASOS DE GASTREENTERITE INFANTIL AGUDA NO DEPARTAMENTO CENTRAL DO PARAGUAI

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Maria Eugenia Galeano Dinatale**

A gastroenterite aguda (GA) é uma causa importante de morbidade e mortalidade infantil, no mundo. Segundo a OMS, as gastroenterites são, junto às infecções respiratórias agudas, os mais importantes agravos à saúde das crianças <5 anos, sendo responsáveis por 17% das 10,4 milhões de mortes a cada ano. No Paraguai, a GA constitui a terceira causa de mortalidade em crianças menores de 5 anos, para as quais a importância epidemiológica e filogenia dos rotavírus A (RV-A) tem sido amplamente descritas. No entanto, pouco se sabe sobre a importância epidemiológica de outros vírus na etiologia da doença. Os norovírus (NoV), gênero *Norovirus* da família *Caliciviridae*, são amplamente reconhecidos como os principais agentes causadores de surtos de GA não bacteriana e como o segundo vírus mais prevalente em infecções esporádicas. Neste estudo foi analisada a presença de NoVs em 378 amostras de fezes, negativas para bactérias patogênicas e RV-A, coletadas de crianças  $\leq 5$  anos de idade atendidas em ambulatórios ou hospitalizadas em Assunção, capital do Departamento Central e do país, Paraguai, no período de 2004/2005. Cento e sessenta e uma amostras (42,6%) foram positivas para NoVs através de ensaio para amplificação parcial do gene da polimerase viral. Nenhum pico sazonal ou diferença na incidência entre faixas etárias foi identificado. NoVs dos genogrupos I e II foram detectados em 42% e 58% das amostras positivas, respectivamente. Os genótipos encontrados foram: GII.4 (18%), GII.17 (18%), mais prevalentes; GII.6 (14%), GII.7 (14%), GII.3 (10%), GII.5 (3%), GII.8 (3%), GII.16 (3%), GI.3 (14%) e GI.8 (3%); e as relações filogenéticas com as estirpes da região e o mundo são apresentadas no presente estudo. Os genótipos GII.5 e GI.8, identificados no mesmo, são descritos pela primeira vez na América do Sul. Os resultados aqui apresentados mostram que NoVs são uma causa importante de GA no Paraguai e seu acompanhamento contínuo será essencial para determinar o impacto real das infecções por estes vírus.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### MOLECULAR DETECTION AND CHARACTERIZATION OF NOROVIRUS STRAINS DETECTED IN GASTROENTERIC CHILDREN FROM CENTRAL DEPARTMENT OF PARAGUAY

#### ABSTRACT

#### MASTER DEGREE DISSERTATION

**Maria Eugenia Galeano Dinatale**

Acute gastroenteritis (AGE) is an important cause of infantile morbidity and mortality worldwide. According to WHO, AGE and the acute respiratory infections are the most important health problems in <5-year-old children, being responsible of 17% of 10.4 million of death every year. In Paraguay, AGE is the third cause of mortality in children <5 years old, for which the epidemiological importance of group A rotaviruses (RV-A) has been extensively described; however, little is known about the importance of other viruses. Noroviruses (NoVs), genus *Norovirus* from the *Caliciviridae* family, are widely recognized as the most important causative agents of non-bacterial AGE outbreaks and the second most prevalent viruses in sporadic infections. In this study we screened the presence of NoVs in 378 fecal samples, negative for pathogenic bacteria and rotavirus group A (RV-A), collected from children  $\leq 5$  years old with AGE, admitted as out- or in-patients in Asuncion, the capital of the Central State and the country, Paraguay, during 2004–2005. One hundred and sixty-one samples (42.6%) were positive for NoVs by partial gene amplification of the viral polimerase. No seasonality or differences in the incidence of the different age-groups were detected. NoV GII and GI were detected in 58% and 42% of the positive samples, respectively. The frequencies of genotypes detected were: GII.4 (18%), GII.17 (18%), the more prevalent; GII.6 (14%), GII.7 (14%), GII.3 (10%), GII.5 (3%), GII.8 (3%), GII.16 (3%), GI.3 (14%) and GI.8 (3%); the phylogenetic relationships among these strains and the ones that circulated in the region and around the world is shown in this study. Genotypes GII.5 and GI.8 are described here for the first time in South America. The results presented here show that NoVs are an important cause of AGE in Paraguay and its continuous monitoring will be essential to determine the real impact in AGE infections.

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. As gastroenterites**

As doenças diarréicas, epidêmicas e esporádicas, são causas comuns de morbidade e mortalidade em pessoas de todas as idades (Bryce *et al* 2005). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as gastroenterites agudas (GA) são, junto com as infecções respiratórias agudas (IRA), os mais importantes agravos à saúde das crianças <5 anos; sendo responsáveis por 17% das mortes anuais nesta faixa etária (Mathers *et al* 2005).

Os casos de gastroenterite aguda são definidos clinicamente pela ocorrência de três ou mais evacuações líquidas ou de pouca consistência em um período de 24 horas, acompanhadas ou não de dois ou mais episódios de vômito ao dia (Rodriguez-Baez *et al* 2002). A doença é causada por agentes infecciosos que aderem ou invadem a mucosa intestinal, assim como pela ação de enterotoxinas produzidas por esses agentes.

Os vírus são importantes agentes etiológicos da GA, principalmente em crianças, os mais relevantes são os Rotavírus (RV), Norovírus (NoV), Astrovírus (AstV) e Adenovírus entéricos (AdV) (Green *et al* 2007, Estes MK & Kapikian AZ 2001, Santos & Soares 2008). Do ponto de vista clínico, as GA causadas por vírus dificilmente podem ser distinguidas daquelas causadas por bactérias, produzindo geralmente um processo autolimitado de diarreia e vômito, com duração aproximada de 1 a 7 dias (Wilhelmi *et al* 2003).

O diagnóstico da etiologia viral das gastroenterites foi estabelecido através do isolamento viral pela técnica de cultura celular; ex. Adenovírus (Hilleman & Werner 1954); das técnicas de detecção de antígenos e, a partir da década de 1970, pelo uso da microscopia eletrônica (ME), que permitiu a identificação dos Rotavirus (Bishop *et al* 1973), Astrovirus (Madeley & Cosgrove 1975) e Norovirus (Kapikian *et al* 1972). Posteriormente, os métodos de biologia molecular demonstraram a real importância dos vírus como agentes etiológicos da doença (Kapikian *et al* 1972; Jiang *et al* 1992a).

## **1.2. Os norovirus**

### **1.2.1. Histórico**

Os primeiros casos reportados de GA datam da década de 1930, quando Zahorsky (1929) descreveu a doença, altamente infecciosa, denominando-a “*winter*

*vomiting disease*”, cujas características clínicas predominantes eram vômito, dores abdominais e diarreia. Dados que foram confirmados em estudos posteriores (Reimann *et al* 1945; Clarke *et al* 1972).

Kapikian e colaboradores (1972) determinaram a etiologia de um surto de GA que ocorreu em uma escola elementar em Norwalk, Ohio, nos Estados Unidos em 1968. Através de ME, observaram partículas esféricas virais de aproximadamente 30 nm de diâmetro e denominaram-nas vírus Norwalk (*Norwalk virus*) (Adler & Zickl 1969; Kapikian *et al* 1972).

A obtenção de anticorpos tanto em condições naturais como em condições experimentais, juntamente com outras evidências, confirmaram o vírus Norwalk como agente etiológico do surto de Ohio, sendo o primeiro vírus descrito como causador da gastroenterite aguda. Posteriormente, o diagnóstico de quadros de GA pela ME resultou na descrição de outros vírus com propriedades e morfologia semelhantes ao do vírus Norwalk, sendo denominados “*Norwalk-like viruses*” (NLV), entre eles foram agrupados vírus emergentes como o vírus de Hawaii, detectado em um surto familiar de gastroenterite ocorrido em Honolulu em 1971, e o vírus de Snow Mountain, proveniente de um surto em um campamento em Colorado, 1976 (Thornhill *et al* 1977; Dolin *et al* 1982; Parashar *et al* 2001; Green *et al* 2007).

### **1.2.2. Classificação**

O vírus Norwalk e os NLVs foram inicialmente descritos como pertencentes à família *Picornaviridae*, baseado na aparência do vírion quando observado à ME (Caul & Appleton 1982; Appleton 1987).

A clonagem e a caracterização molecular do genoma viral por Xi e colaboradores (1990) viabilizaram a expressão do capsídeo viral (*Virus Like Particles*, VLPs) em sistemas heterólogos, permitindo o melhor entendimento da composição molecular do vírus, além do desenvolvimento de métodos de diagnóstico. A produção de VLPs possibilitou o desenvolvimento de métodos imunoenzimáticos (EIA) de detecção de antígenos (Ags) e anticorpos (Acs) que, em conjunto com os testes moleculares, permitiram evidenciar a importância epidemiológica destes vírus. Posteriormente, o gene que codifica a proteína do capsídeo dos NLV foi clonado, permitindo avanços na compreensão do genoma viral (Xi *et al* 1990; Leite *et al* 1996).

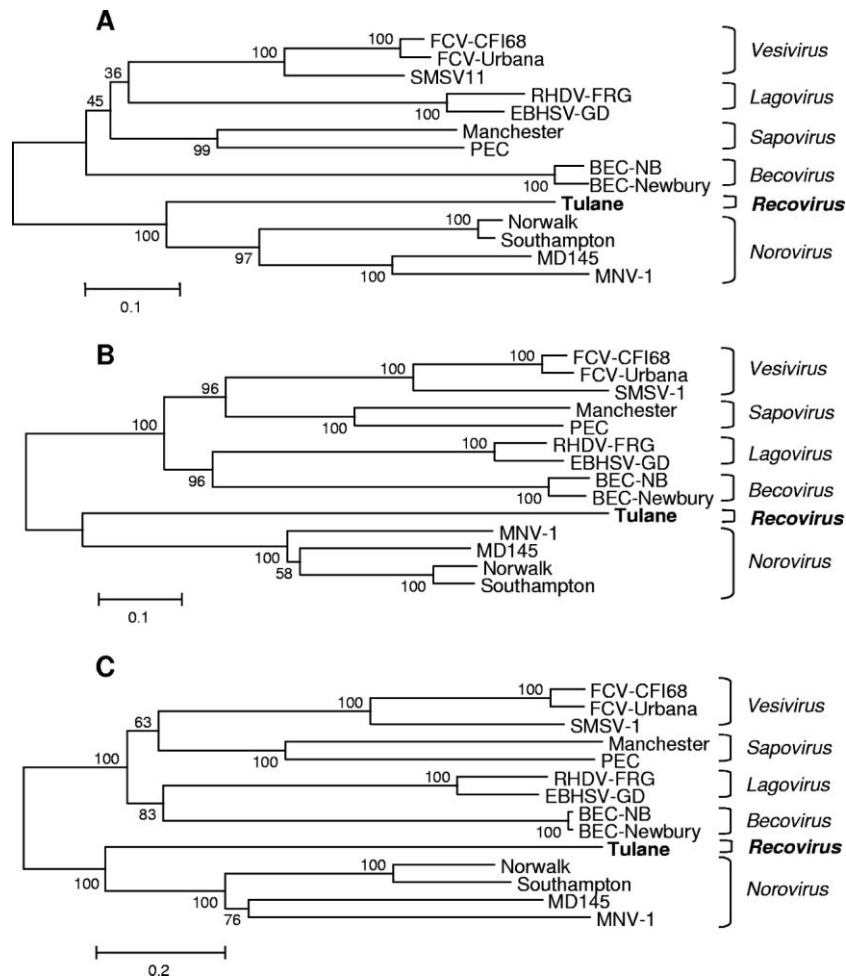
Com base nos estudos do genoma dos diferentes NLVs o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (*International Committee for Taxonomy of Viruses, ICTV*) decidiu, no ano 2002, pela classificação destes vírus no gênero *Norovirus*, da família *Caliciviridae*. Este nome deriva da palavra latina "*calix*", que significa cálice, por causa da forma observada na superfície das partículas virais quando visualizadas através de ME. No entanto, geralmente os norovirus (NoV) não apresentam sua morfologia típica nas imagens produzidas por essa técnica (Caul & Appleton 1982; Appleton 1987; Jiang *et al* 1993; ICTV 2010).

Outra particularidade do genoma destes vírus, que permitiu a sua classificação como membro da família *Caliciviridae*, é o RNA subgenômico que codifica para as proteínas do capsídeo. A síntese do RNA subgenômico em células infectadas com calicivírus demonstrou uma grande diferença entre as estratégias de replicação e, conseqüentemente, entre as famílias dos calicivírus e os picornavírus (Ehresmann & Schaffer 1977; Green *et al* 2007).

Atualmente, a família *Caliciviridae* é constituída por cinco gêneros: *Norovirus*, representado pelo "*Norwalk virus*"; *Vesivirus*; *Lagovirus*; *Sapovirus* e o *Nebovirus* (anterior *Becovirus*), recentemente reconhecido pelo ICTV como o quinto e mais novo gênero da família (Green *et al* 2000; Smiley *et al* 2002). Alguns autores sugerem a existência de um sexto gênero, o *Recovirus*, caracterizado pelo "*Tulane vírus*" um novo calicivírus, porém ainda em espera de revisão pelo ICTV. Os gêneros *Norovirus* e *Sapovirus* formam o grupo de calicivírus que infectam humanos (HuCV) (Farkas *et al* 2008; Farkas *et al* 2010; Tan *et al* 2009) (**Figura 1**).

Até o momento, os NoVs humanos não foram isolados em cultura celular e por este motivo não é possível a sorotipagem direta utilizando anticorpos neutralizantes. A transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) e o sequenciamento genômico têm demonstrado que esses vírus são genética e antigenicamente diversos (Zheng *et al* 2006).

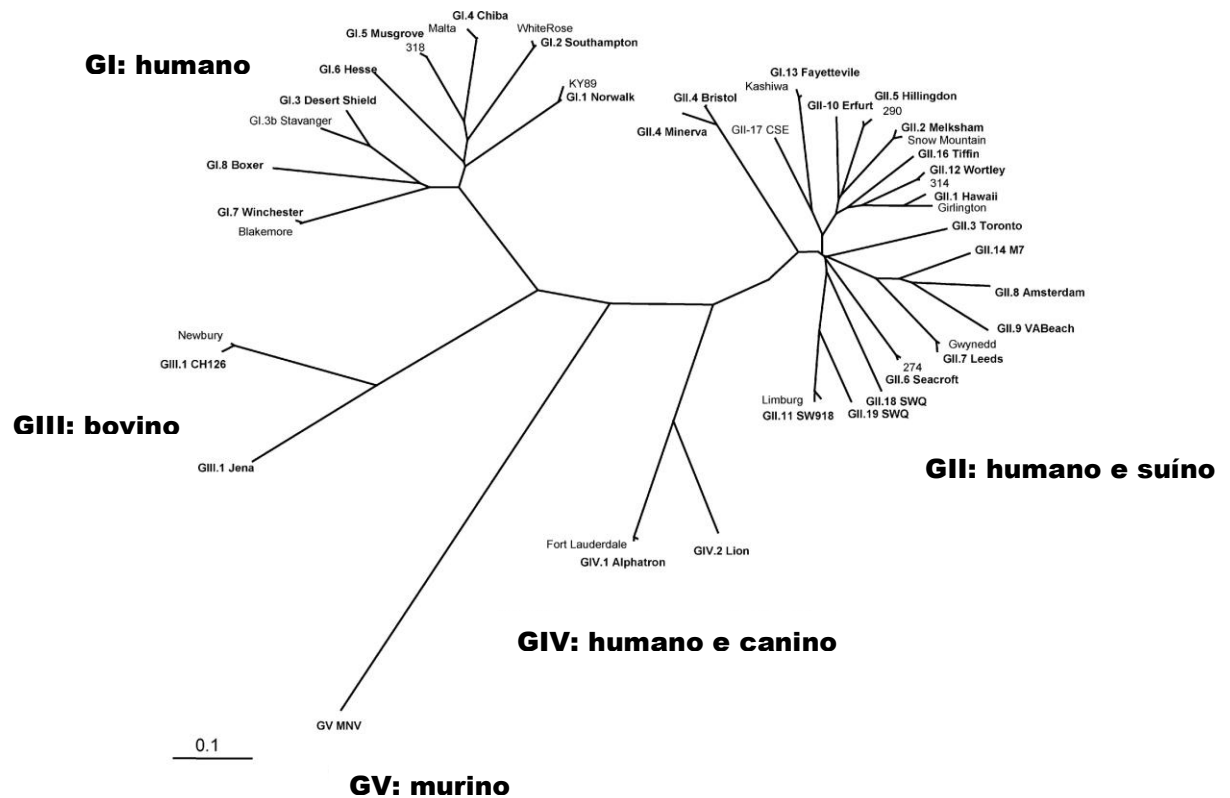




**Figura 1: Filogenia da família *Caliciviridae*.** Árvores construídas com base em alinhamentos de seqüências de aminoácidos da nucleosídeo trifosfato hidrolase (NTPase) (A), da polimerase (B), e da proteína do capsídeo viral (VP1) (C). A barra de escala representa a distância filogenética expressa em unidades de substituições de aminoácidos por sítio. Adaptado de Farkas *et al* 2008.

Baseado na análise da seqüência parcial ou completa dos genes que codificam a RNA polimerase viral ou a proteína do capsídeo viral (VP 1), os NoVs são classificados em 5 grupos genéticos, os genogrupos (GI a GV). Mesquita e colaboradores (2010) sugerem um sexto genogrupos, baseados na divergência entre as seqüências nucleotídicas de um NoV canino, recentemente descrito, e as variantes descritas nos outros gêneros. Como regra geral, considera-se que as estirpes que compartilham >85% de identidade de aminoácidos (aa) se encontram dentro de um mesmo genótipo (>97% de identidade nucleotídica no nível genômico) (*cluster* genético), estirpes de diferentes genótipos dentro do mesmo genogrupos compartilham entre 55% e 85% de identidade de

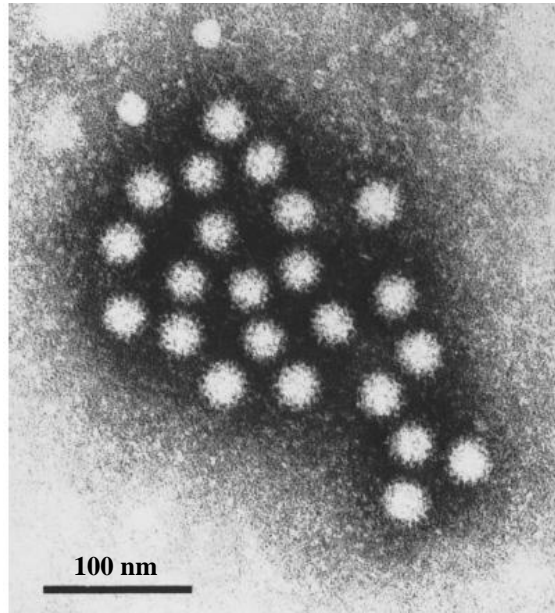
aa (69 – 97% de identidade nucleotídica); entretanto, as estirpes de diferentes genogrupos estão mais distantes, com 51-56% do genoma similaridade de nucleotídeos (Katayama *et al* 2002b; Zheng *et al* 2006; Mesquita *et al* 2010). Com base nesses critérios, foram identificados pelo menos 32 genótipos de NoV (Zheng *et al* 2006; Martella *et al* 2007; Patel *et al* 2008; Patel *et al* 2009) (**Figura 2**).



**Figura 2: Classificação dos Norovirus.** Com base na diversidade genética da sequência completa do gene que codifica a VP1, os NoV são classificados em 5 genogrupos (GI a GV) e 32 genótipos. As cepas humanas se agrupam entre os genogrupos GI, GII e GIV. Adaptado de Zheng *et al* 2006 e Patel *et al* 2009.

### 1.2.3. Morfologia e Características Biológicas

As partículas virais são esféricas, medem de 30-40 nm de diâmetro e apresentam 32 depressões grandes na superfície do capsídeo (Green *et al* 2007) (**Figura 3**).

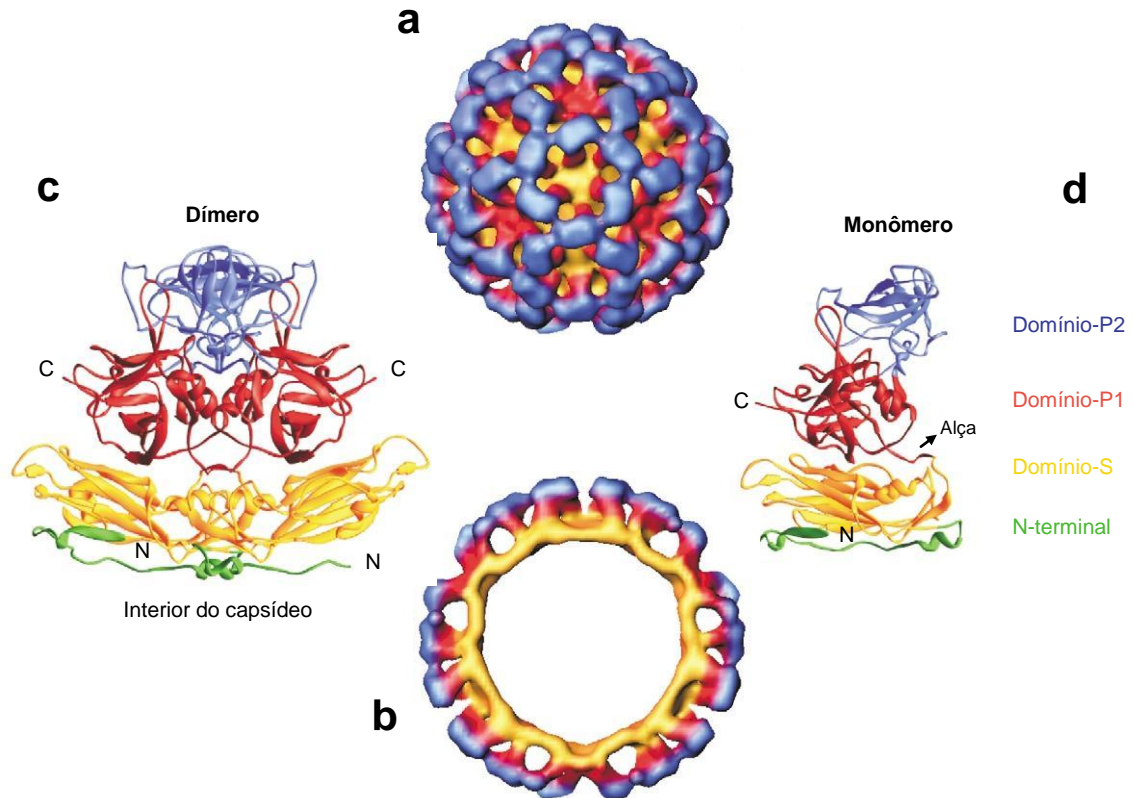


**Figura 3: Micrografia eletrônica dos norovírus.** Partículas virais de NoV em uma suspensão fecal visualizada através de ME. Adaptado de Fankhauser *et al* 2002.

Os *Norovirus* são vírus não envelopados e contém um genoma de RNA de fita simples, com polaridade positiva, que está protegido pelo capsídeo constituído por múltiplas cópias da proteína viral VP1, e de algumas cópias de uma segunda proteína básica, a VP2 (Greenberg *et al* 1981).

As técnicas de ME, cristalografia de raios X e computacionais de processamento de imagem têm sido utilizadas para o estudo da estrutura tridimensional de VLPs e demonstraram que os NoVs exibem uma simetria icosaédrica, de número de triangulação igual a três ( $T=3$ ), com as 180 moléculas da proteína do capsídeo organizadas em 90 dímeros (Thouvenin *et al* 1997; Prasad *et al* 1999) (**Figura 4**).

Na proteína VP1, dois domínios conservados delimitam um domínio central variável que provavelmente carrega os determinantes antigênicos que definem a especificidade das estirpes. Dessa forma, acredita-se que as proteínas do capsídeo não só providenciam sustento estrutural para o vírus, mas também contém sítios de união aos receptores e determinantes do fenótipo e sorotipo viral (Bertolotti-Ciarlet *et al* 2003).



**Figura 4: Representações da estrutura do capsídeo viral dos norovírus (VLP NoV).**

Representações da partícula: superfície (a); corte transversal e fundo (b). Dímeros da proteína do capsídeo (c) montados em simetria icosaédrica ( $T = 3$ ). Cada proteína monomérica do capsídeo (d) está dividida em uma região N-terminal (verde) de frente para o interior da VLP; um domínio *Shell* (Domínio-S, amarelo) que forma a superfície contínua da VLP; um domínio saliente (Domínio-P), que emana da superfície do domínio-S. O domínio-P encontra-se dividido em subdomínios P1 e P2 (vermelho e azul, respectivamente) com o subdomínio-P2 na superfície mais distal da VLP. Adaptado de Hutson *et al* 2004.

Os NoVs de humanos possuem densidade de 1,33 a 1,41 g/cm<sup>3</sup> em cloreto de cério (CsCl). Esses vírus mantêm infecciosidade após: a) exposição do filtrado fecal a pH 2,7 por 3 horas à temperatura ambiente; b) tratamento com éter 20%, a 40°C por 18 horas; c) incubação a 60°C por 30 minutos (Dolin *et al* 1972).

As partículas virais são resistentes à inativação pelo tratamento com cloro na concentração de 3,75 a 6,25mg/L (cloro residual livre usualmente encontrado na água distribuída pelo sistema de abastecimento é de 0,5 a 1,0mg/L). A inativação só é alcançada após tratamento com cloro a 10mg/L, confirmando-se que os NoVs são mais

resistentes que os poliovírus tipo 1, rotavírus grupo A (RV-A) e ao bacteriófago F2 (Keswick *et al* 1985; Green *et al* 2007).

#### 1.2.4. Genoma e proteínas virais

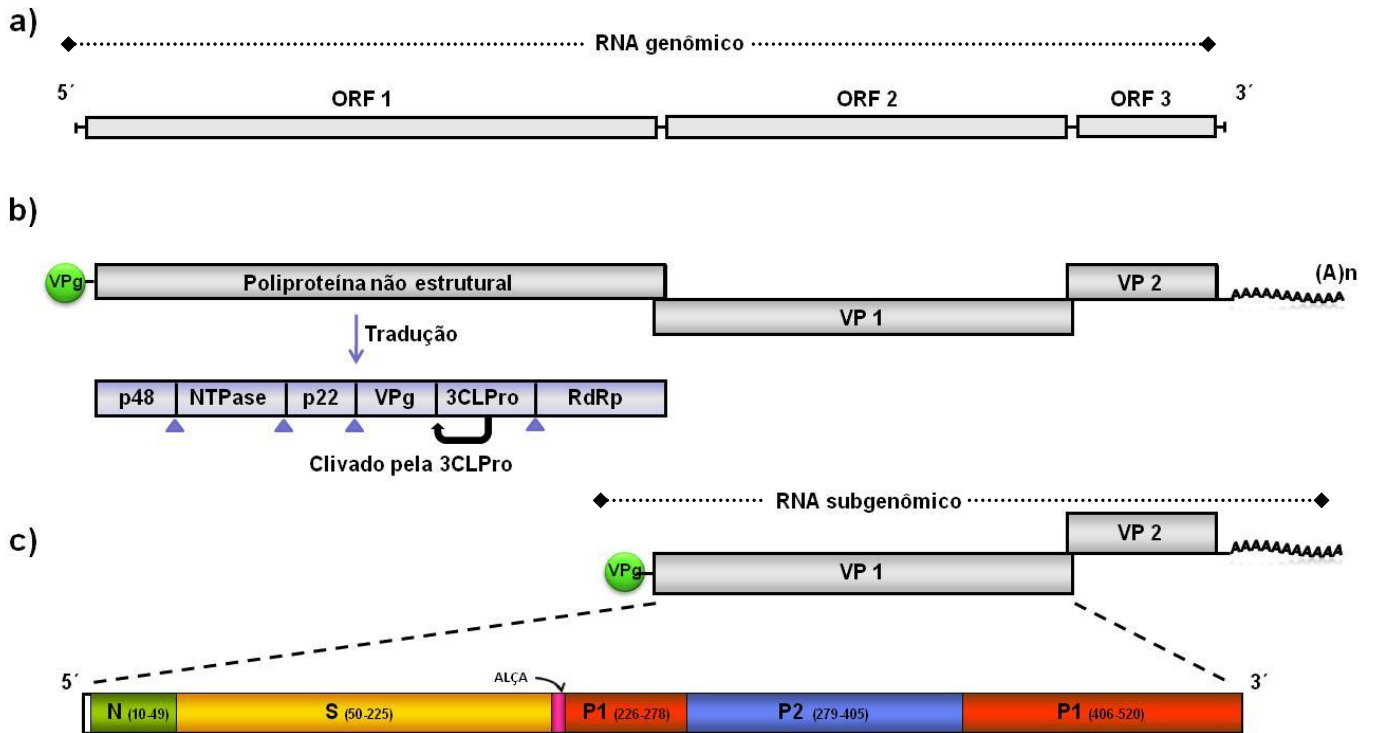
Os calicivírus possuem características que os distinguem de outros vírus de RNA positivo: a) o terminal 5' do seu genoma está covalentemente ligado a uma proteína viral (VPg), que serve como um iniciador para a replicação do genoma e dirige a tradução de proteínas virais (Goodfellow *et al* 2005); b) a extremidade 3' contém uma região curta não traduzida, assim como uma cauda poliadenilada (poli A); c) existem várias fases abertas de leitura (*Open Reading Frames*, ORFs) no genoma, nos NoV a maior delas, a ORF1 de aproximadamente 5000 nt, é traduzida do RNA viral genômico para a produção de proteínas não-estruturais (poliproteína); d) a tradução da principal proteína estrutural, nos NoV codificada pela ORF2, acredita-se ser dependente da produção de um RNA subgenômico, que também permite a expressão da ORF3 pelo mecanismo de tradução, terminação e reinício (TTR) que ocorre entre as ORFs 2 e 3 (Glass *et al* 2000a; Naphthine *et al* 2009) (**Figura 5**).

O genoma dos NoV possui cerca de 7.5-7.7 kb de tamanho e está organizado em três ORFs. A ORF1 codifica uma poliproteína de 200 kilodaltons (kDa) que é processada por proteólise originando 6 proteínas não estruturais: proteína de 48 kDa (p48), nucleosídeo trifosfatase (NTPase), proteína de 22 kDa (p22), VPg, 3C-like Protease (3CLpro) e a RNA polimerase RNA dependente (RdRp) (Belliot *et al* 2003). Essas proteínas são processadas co- e pós-traducionalmente pela 3CLpro viral (Green *et al* 2007). As duas proteínas estruturais: a VP1 e a VP2, são codificadas pelas ORFs 2 e 3, respectivamente (Glass *et al* 2000a; Pletneva *et al* 2001) (**Figura 5**).

A RdRp dos NoVs é codificada pela região que compreende os aminoácidos da posição 1281 até a extremidade carboxi-terminal da ORF1 e apresenta elementos estruturais (domínios) e catalíticos característicos das RdRps de vírus de RNA de polaridade positiva (Hardy 2005).

A proteína VP1, que é composta por cerca de 530-555 aa e possui 58-60 kDa de massa molecular, está organizada em dois domínios principais unidos por uma “alça” ou “dobradiça” (*hinge*): a) o domínio mais interno do capsídeo, relativamente conservado, compreende um braço N-terminal e é denominado domínio S (*shell*) (aa 1 a 225); b) um

domínio mais externo denominado P (*protruding*) (aa 226 a 530) (Tan & Jiang 2007). O domínio P, por sua vez, está subdividido em dois subdomínios: interno P1 e externo P2, que interagem em contatos diméricos, aumentando a estabilidade e formando as proeminências no capsídeo viral (Jiang *et al* 1992a; Thouvenin *et al* 1997; Prasad *et al* 1999; Hardy 2005) (Figura 4).



**Figura 5: Representação esquemática da organização genômica dos norovírus.** a) Representação das 3 ORFs: ORF 1 dá origem a proteínas estruturais; ORFs 2 e 3 originam as proteínas que constituem o capsídeo viral. b) Poliproteína não estrutural composta por domínios: p48: proteína amino terminal; NTPase: proteína nucleosídeo trifosfatase; p22: proteína p22; VPg: proteína viral de ligação ao genoma; 3CLPro: protease 3C-like; RdRp: RNA polimerase; VP1: proteína principal do capsídeo; VP2: proteína menor do capsídeo; triângulos azuis e seta escura: sítios de clivagem proteolítica pela 3CLPro; (A)n: Cauda Poli(A); aa: aminoácido. c) RNA subgenômico contendo os genes que codificam as proteínas virais do capsídeo. A VP1 é constituída por: N: região amino terminal, S, P1, P2: subdomínios da proteína VP1. Adaptado de Meyers (2000), Donaldson (2008) e de ViralZone (Bioinformatics 2010).

O subdomínio P2 é a região mais variável do capsídeo apresentando a sequência de maior divergência no genoma dos NoV. Esse domínio tem um papel importante na

maioria das interações com receptores da superfície celular no epitélio intestinal, além disto é o principal sítio de reconhecimento imunológico e de imunogenicidade do virion (Prasad *et al* 1999; Nilsson *et al* 2003; Tan *et al* 2003; Tan *et al* 2004; Chakravarty *et al* 2005; Hardy 2005) (**Figura 5**).

A organização em módulos S-P1-P2, encontrado em outros calicivírus, outorga à principal proteína capsídeo suas propriedades de montagem, de interação com receptores e de imunogenicidade, apesar da grande variabilidade (Chen *et al* 2004).

A proteína VP2, constituída por 268 aa, apresenta alta variabilidade genética na sequência nucleotídica entre diferentes estirpes virais. Na partícula viral, estão presentes apenas uma ou duas cópias da VP2. A função desta proteína está associada com a estabilização da VP1 na estrutura do vírus, protegendo-a da degradação produzida especialmente pelas proteases, sendo essencial para a síntese das partículas infecciosas (Hardy 2005).

#### **1.2.5. Transcrição e Replicação**

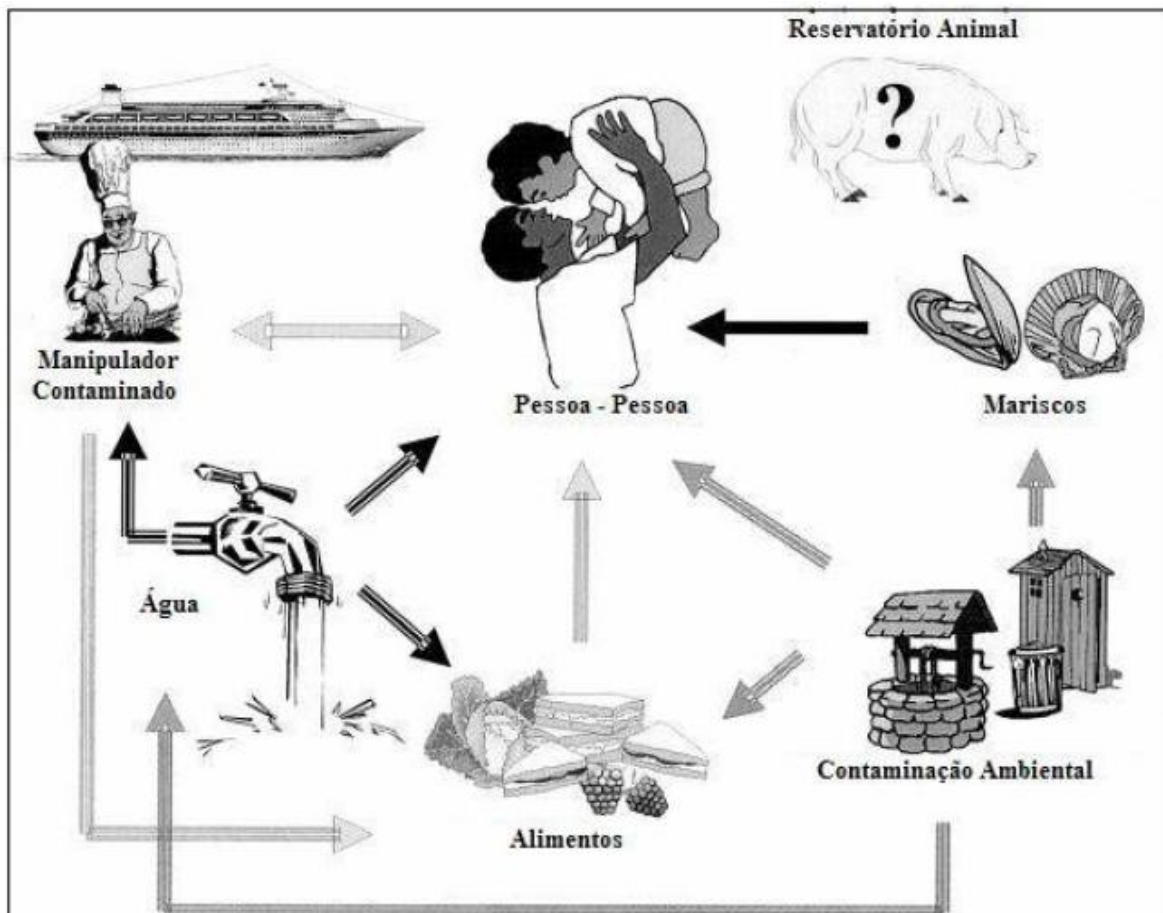
A estratégia de replicação dos NoVs ainda não está totalmente esclarecida. Até o momento, sabe-se que segue a estratégia de outros vírus com genoma de RNA de polaridade positiva. Após a interação da partícula viral com a célula hospedeira, através do reconhecimento e união com os antígenos de grupo sanguíneo humano (HBGA) nos tecidos intestinais de indivíduos secretores (expressores do antígeno H), ocorre a entrada do vírus na célula e, subsequente liberação do RNA viral no citoplasma celular (Marionneau *et al* 2002, Cao *et al* 2007). O início da tradução da fita positiva do genoma é mediado por interações da proteína VPg, ligada ao RNA genômico, com mecanismos de tradução celular (Goodfellow *et al* 2005; Guix *et al* 2007).

A ORF1 é inicialmente traduzida para produção de uma poliproteína não estrutural que, em seguida, é processada pela proteinase viral, originando as proteínas não estruturais. A síntese da fita negativa de RNA, a partir do molde do RNA genômico positivo, se inicia na extremidade 3' da fita molde positiva e envolve interações com proteínas virais. A fita negativa serve como molde para a transcrição de novas fitas de RNA genômico e subgenômico. A grande quantidade de RNA subgenômico positivo viral serve como molde para a tradução das proteínas estruturais VP1 e VP2 (**Figura 5**). A replicação do RNA viral está associada com membranas celulares do hospedeiro. Os

mecanismos de empacotamento do RNA, a maturação e a liberação da partícula viral ainda não estão totalmente esclarecidos (Green *et al* 2007).

### 1.3. Transmissão

O modo mais frequente de infecção do NoV é através da via fecal-oral, pela ingestão de água ou alimentos contaminados (infecção primária) ou pela transmissão de pessoa a pessoa (infecção secundária) (Lopman *et al* 2003b) (**Figura 6**). A alta infecciosidade e a baixa dose infecciosa dos NoVs (10 - 100 partículas virais) (Kapikian *et al* 1996) possibilitam o transporte das partículas virais através de aerossóis, gotas, fômites, água, alimentos e pela contaminação ambiental (Schaub & Oshiro 2000) e conferem alta eficiência na transmissão. Teunis e colaboradores (2008) demonstraram que a probabilidade de desenvolver a infecção após a administração de uma única partícula viral infecciosa é de 50%.



**Figura 6: Principais vias de transmissão dos Norovirus.** Adaptado de Moreno-Espinosa *et al* 2004.



A possibilidade de excreção prolongada de partículas virais, por até mais de 20 dias, que pode acontecer entre pacientes assintomáticos, acrescenta o risco de infecções secundárias e é de grande importância na transmissão entre trabalhadores de serviços de alimentação (Rockx *et al* 2002).

A dispersão por água recreacional, água potável e alimentos (Keswick *et al* 1985; McDonnell *et al* 1997) é usual devido à resistência dos NoV a: altos níveis de cloro, a uma ampla margem de temperatura (de 0°C a 60°C) e a sua resistência no ambiente. Por esses motivos, os NoVs causam surtos de gastroenterite principalmente em ambientes de uso coletivo ou de confinamento tais como: hospitais, escolas, restaurantes, clínicas geriátricas, penitenciárias, cruzeiros e estabelecimentos militares, afetando indivíduos de todos os grupos etários (McCarthy *et al* 2000; Rockx *et al* 2002; Widdowson *et al* 2005).

Os moluscos filtradores são altamente apreciados na culinária de alguns países e podem ser contaminados com patógenos humanos quando cultivados em águas contaminadas por esgotos, o que pode levar à doença quando consumidos crus ou mal cozidos. Apesar dos controles nas zonas de cria e colheita de mariscos, os surtos de gastroenterite, em particular associadas ao consumo de ostras contaminadas com NoV, continuam acontecendo (Westrell *et al* 2010, Alfano-Sobsey *et al* 2011, Victoria *et al* 2010a). Devido a isso, vigilância e controle da contaminação são essenciais para evitar surtos e perdas econômicas nas regiões produtoras (Dore *et al* 2010).

#### **1.4. Patogênese e Manifestações Clínicas**

A infecção por NoV ocorre no intestino delgado provocando um achatamento rápido e reversível das vilosidades e encurtamento das microvilosidades, provocando lesões na mucosa que resulta no surgimento da diarreia. Nos pacientes infectados se observa uma redução na área de superfície das vilosidades do duodeno intestinal (Troeger *et al* 2009).

Após o período de incubação do vírus, que varia de 24 a 48 horas, ocorrem as principais manifestações clínicas: diarreia e vômito, podendo estar acompanhadas por náusea, dor abdominal, cefaléia, febre e mialgia. Em geral, a diarreia é autolimitada, com duração de 4 a 6 dias (Green *et al* 2007).

A diarreia é mais prevalente em crianças menores de um ano de idade; enquanto que o vômito é mais freqüente em maiores de cinco anos de idade. Na maioria dos casos não existe a presença de sangue ou muco nas fezes, que são geralmente aquosas (Rockx *et al* 2002; Lopman *et al* 2004b).

Apesar da gastroenterite causada pelos NoV ser geralmente de intensidade média, a doença grave pode levar pacientes imunocomprometidos ou subnutridos ao óbito por causa da desidratação, que acomete principalmente crianças menores de cinco anos de idade e idosos maiores de 65 anos (Jiang *et al* 1996; Green *et al* 2002; Gallimore *et al* 2004a; Kaufman *et al* 2005; Mattner *et al* 2006; Simon *et al* 2006; Tsugawa *et al* 2006; Harris *et al* 2008).

### **1.5. Epidemiologia**

Os norovírus (NoVs) e os sapovírus (SaVs) são reconhecidos como a principal causa de GA em todo o mundo (Vinje *et al* 2000, Koopmans *et al* 2001, Green *et al* 2007). Esses vírus diferem nas suas epidemiologias e na variedade de hospedes. As infecções por NoV são comuns em todas as faixas etárias e são responsáveis por cerca de 80% de todos os surtos de GA (Svrakas *et al* 2007). Por outro lado, as infecções por SaV são menos comuns e reconhecidos por causar doenças principalmente em crianças, geralmente menores de 5 anos (Hansman *et al* 2006, Phan *et al* 2006b, Hansman *et al* 2007a, Ike *et al* 2008), porém existem relatos recentes da importância dos SaVs como causa ocasional de surtos em hospitais e outros serviços de saúde, acometendo outros grupos etários, de adultos jovens a idosos (Koopmans *et al* 2001, Johansson *et al* 2005, Hansman *et al* 2007b, Ishida *et al* 2008, Pang *et al* 2008, Wu *et al* 2008).

Apesar da diarreia associada a SaV ser geralmente leve em humanos, casos graves podem ocorrer (Robinson *et al* 2002). Esses vírus são patógenos entéricos importantes também em suínos e martas (Guo *et al* 1999, Guo *et al* 2001, Martella *et al* 2008c, Nakamura *et al* 2010). Várias estirpes de SaV que infectam suínos mostraram ter semelhança genética aos SaVs que infectam humanos (L'Homme *et al* 2009, Martella *et al* 2008c), o que sugere um potencial de circulação zoonótica de SaV entre humanos e suínos (Nakamura *et al* 2010, Svraga *et al* 2010).

Atualmente, pela utilização das técnicas de biologia molecular, os NoV têm sido reconhecidos como responsáveis por mais de 90% dos surtos de gastroenterite viral

aguda no mundo, sendo associados a 1,1 milhões de hospitalizações e 218.000 mortes em crianças de países em desenvolvimento (Patel *et al* 2008; Scallan *et al* 2011).

Os NoVs são reconhecidos mundialmente como os mais importantes vírus na etiologia dos surtos de GA, que ocorrem principalmente como resultado de contaminação de alimentos e água (Atmar & Estes 2006). Nos Estados Unidos, o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estimou a existência de aproximadamente 23 milhões de infecções por NoV por ano, principalmente entre pessoas de maior idade, com ocorrência de surtos em casas de retiro (Jiang *et al* 1996; CDC 2003; Ike *et al* 2006).

Na América do sul, os NoVs foram descritos no Chile, na Argentina, no Peru e no Brasil relacionados a casos esporádicos e surtos de gastroenterite aguda. Nestes países, estudos de caracterização molecular e de monitoramento de amostras clínicas e ambientais demonstraram a importância epidemiológica do vírus (Bereciartu *et al* 2002; Parashar *et al* 2004; Vidal *et al* 2006; Gomes *et al* 2007; Victoria *et al* 2007; Andreasi *et al* 2008; Ferreira *et al* 2010).

Vários estudos demonstraram a presença de NoV na população pediátrica em vários países incluindo Argentina, onde foram analisadas amostras procedentes de crianças hospitalizadas e não hospitalizadas em Mendoza e Buenos Aires (Bereciartu *et al* 2002; Martinez *et al* 2002). Foram detectadas taxas de até 53% de infecções por NoV em casos de surtos de GA provenientes de diversas regiões da Argentina durante os anos 2005 e 2006 (Gomes *et al* 2008).

Na Nicarágua e no Peru os NoV foram identificados, por métodos moleculares ou sorológicos, em 15% e 55% das crianças até 5 anos de idade hospitalizadas como casos esporádicos, respectivamente (Parashar *et al* 2004; Bucardo *et al* 2008). Bucardo e colaboradores (2008) reportaram pelo menos 6 genótipos diferentes circulando nos anos 2005 e 2006 em crianças de até 4 anos de idade.

No Brasil, Parks e colaboradores (1999) realizaram um estudo coorte com crianças provenientes de comunidades carentes (*favelas*) e crianças hospitalizadas com GA recorrente em Fortaleza, Ceará e reportaram a diversidade genômica dos NoVs encontrados em casos esporádicos. Talal e colaboradores (2000) descreveram taxas de

até 71% de soro-prevalência de NoV nessas mesmas amostras, em um estudo retrospectivo. Um estudo similar foi realizado por Gabbay e colaboradores (1994) onde foi examinada a soroepidemiologia das infecções por vírus Norwalk entre os ameríndios pertencentes a oito comunidades relativamente isoladas na região amazônica por meio de ensaio imunoenzimático com antígenos recombinantes do vírus.

No Rio de Janeiro, São Paulo, Recife e Espírito Santo foram detectados e caracterizados molecularmente os NoVs coletados de crianças com GA hospitalizadas (Castilho *et al* 2006; Soares *et al* 2007; Victoria *et al* 2007; Nakagomi *et al* 2008; Ribeiro *et al* 2008), sintomáticas ou assintomáticas (Barreira *et al* 2010).

Gallimore e colaboradores (2004) e Ferreira e colaboradores (2008) reportaram surtos de GA acontecidos em creches no estado do Rio de Janeiro.. Em 2008, Campos e colaboradores (2008) descreveram infecções por NoV em adultos com GA, atendidos em hospitais da rede de vigilância na Bahia, Brasil; esse estudo reportou o primeiro surto de GA por NoV ocorrido nesse estado entre 2002 e 2006.

No Chile, O’Ryan e colaboradores (2000) detectaram anticorpos para as estirpes México e Norwalk em 67% dos adultos analisados, e determinaram uma prevalência de 8% de infecção por NoV nas crianças hospitalizadas em Santiago de Chile durante os anos 1997 a 1999. Os calicivírus causaram 45% dos 55 surtos de GA ocorridos em Santiago, Chile, durante os anos 2000-2003, associados ao consumo de frutos do mar (Vidal *et al* 2005).

Existem alguns estudos realizados na América do Sul reportando a presença de NoV em diferentes matrizes aquáticas (Miagostovich *et al* 2008; Victoria *et al* 2010a), e em águas residuais (Victoria *et al* 2010b).

Os NoV que infectam humanos estão classificados nos genogrupos GI, GII e GIV; não existindo reação cruzada entre os soros de pacientes infectados com genogrupos diferentes. Estudos de caracterização molecular dos NoVs nos casos de GA revelam uma frequente co-circulação de diferentes genótipos, porém os dos genogrupos I e II são responsáveis por >75% dos casos analisados. Vários estudos demonstraram ao GII como o genogrupo mais prevalente entre os NoV detectados em humano e mais freqüentemente associado com epidemias e casos esporádicos, quando comparado ao GI

(Noel *et al* 1999, Bull *et al* 2010). O genótipo GII.4, a exemplo do que ocorre no mundo, é o mais prevalente na América do Sul. O genótipo do genogrupo I mais prevalente no mundo é o GI.3 (Vinje & Koopmans 2000; Lopman *et al* 2004a; Widdowson *et al* 2004; Bull *et al* 2006; Phan *et al* 2006a; Gomes *et al* 2007; Ferreira *et al* 2010).

Os NoVs GIV ou 'Alphatron-like' raramente têm sido detectados em amostras fecais de pacientes com gastroenterite (Vinje & Koopmans 2000, Fankhauser *et al* 2002, Iritani *et al* 2002, La Rosa *et al* 2008) e, assim, a sua prevalência e epidemiologia molecular não estão bem caracterizados.

Devido à rápida evolução dos NoVs, novas variantes surgem com frequência, substituindo as variantes antigas e se disseminando em diferentes regiões do mundo rapidamente. Recentemente, duas novas variantes do genótipo GII.4, uma europeia e outra encontrada em New Orleans, foram descritas nos Estados Unidos (Lopman *et al* 2004b; Bull *et al* 2010).

Uma vez que o gênero *Norovirus* compreende vírus que infectam humanos, suínos, bovinos e camundongos, a possibilidade de transmissão zoonótica da infecção existe. Em geral, a transferência zoonótica pode ocorrer indirectamente através da cadeia alimentar ou directamente através do contato com animais. A semelhança genética entre os NoVs suínos e os NoVs humanos do genogrupo GII sugere o potencial de transmissão interespecie (van Der Poel *et al* 2000; Mattison *et al* 2007; Martella *et al* 2008a; Martella *et al* 2008b). Mattison e colaboradores (2007), utilizando um protocolo de RT-PCR para a detecção do NoV de humanos, têm demonstrado a ocorrência de infecções naturais de espécimes animais com estirpes humanas do genótipo GII.4. Esses estudos tem criado a preocupação sobre a possível emergência de estirpes recombinantes suíno/humano ou bovino/humano com características de tropismo ou virulencia alteradas (Mattison *et al* 2007).

O padrão de sazonalidade das infecções por NoV ainda não está bem esclarecido. Esses vírus são responsáveis por casos de gastroenterite aguda que ocorrem durante todo o ano. Contudo, nos países com clima temperado, picos de detecção têm sido identificados frequentemente no período do inverno (Patel *et al* 2009).

## 1.6. Detecção e Diagnóstico laboratorial

A detecção imediata do NoV é crucial para o controle da distribuição do vírus nos surtos (Friesema *et al* 2009; Harris *et al* 2010). A sorotipagem direta baseada na neutralização não é possível devido a não disponibilidade de um sistema de cultura de células para o isolamento viral, assim como, até o momento, não existe modelo animal que possa reproduzir a doença (Glass *et al* 2000b; Duizer *et al* 2004). Como consequência, testes moleculares entre os quais a RT-PCR (qualitativa e quantitativa [qRT-PCR]) e o sequenciamento genômico têm sido utilizados na caracterização do vírus (genotipagem) e no entendimento da relação existente entre as diferentes estirpes virais (Jiang *et al* 1993; Ando *et al* 2000; Katayama *et al* 2002a).

As partículas de NoV podem ser observadas nas fezes por ME a partir dos primeiros sintomas da infecção. A ME detecta aproximadamente  $10^6$  partículas por mg de fezes, sendo esta a taxa de excreção destes vírus por pessoas infectadas. A ausência de partículas com a característica peculiar dos calicivírus (forma de cálice) pode dificultar sua identificação por este método (Caul & Appleton 1982; Kapikian 1994; Glass *et al* 2000b). Quando comparada com ELISA a sensibilidade da ME é menor que 25% e a especificidade circunda o 99% (Richards *et al* 2003).

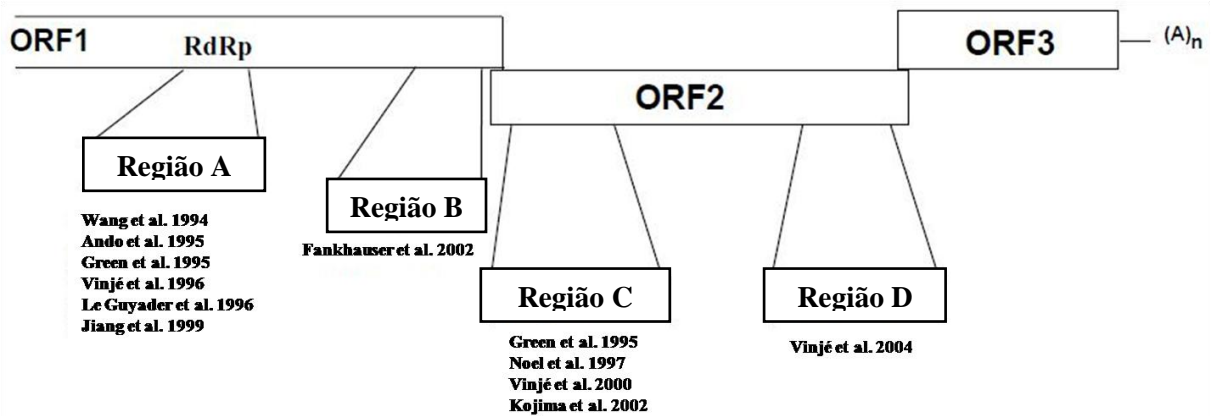
Os EIA para detecção de NoV tornaram-se possíveis quando Jiang e colaboradores (1992b) estabeleceram um sistema para expressão de proteínas do capsídeo do NoV em baculovírus, permitindo tanto a obtenção de antígeno viral, como a produção de soro hiperimune em animais (Jiang *et al* 1992b; Leite *et al* 1996; Lopman *et al* 2002). Antígenos recombinantes foram desenvolvidos para detecção de diferentes vírus do gênero *Norovirus*, tais como: México, Snow Mountain e Hawaii (Noel *et al* 1997; Lopman *et al* 2002).

Embora os EIAs apresentem baixa especificidade devida à grande diversidade antigênica desses vírus, é uma metodologia aplicável em surtos como teste de triagem. Um teste mais sensível e específico, como a RT-PCR, deve ser aplicado nas amostras que apresentarem resultado negativo por EIA (Jiang *et al* 2000; Richards *et al* 2003). Quando comparados com a RT-PCR, os EIAs como ELISA apresentam uma sensibilidade de 55% e especificidade de 98% (Richards *et al* 2003).

A clonagem e o sequenciamento dos vírus Norwalk e Southampton permitiram grandes avanços nos estudos e na determinação da importância epidemiológica dos NoV como agente etiológico causador de diarreia aguda (Lambden *et al* 1993). Após o sequenciamento completo do genoma dos calicivírus humanos, diversos iniciadores foram desenhados, visando a amplificação de diferentes regiões alvo para serem utilizadas no diagnóstico pela técnica de RT-PCR (Jiang *et al* 1993; Dingle *et al* 1995) (**Figura 7**). Esta técnica apresenta sensibilidade de aproximadamente  $10^2$  a  $10^3$  partículas virais, sendo capaz de detectar o vírus até duas semanas após a infecção (Noel *et al* 1997; Parashar *et al* 1998; Atmar & Estes 2001; Lopman *et al* 2002).

A informação acumulada sobre as sequências foi especialmente útil para o diagnóstico e classificação viral, e muitos pesquisadores escolheram iniciadores para PCR baseados em regiões conservadas do genoma, como o gene da RdRp, com o fim de detectar e diferenciar a maior quantidade de estirpes. As regiões alvo são: região A (gene da RdRp, ORF1), região B (o extremo 3' da ORF1), região C (um fragmento curto perto do extremo 5' da ORF2), e a região D (no extremo 3' da ORF2) (Ando *et al* 2000; Vinje *et al* 2004) (**Figura 7**).

Devido a grande diversidade genética dos NoV, não existem iniciadores capazes de amplificar todos os genótipos que circulam em humanos. Frequentemente, é necessária a utilização de uma mistura de iniciadores específicos para a detecção dos diferentes genogrupos (GI, GII, GIV), mesmo quando se utiliza iniciadores que amplifiquem regiões conservadas do genoma, como a RpRd. Para a caracterização genética dos NoV é necessário a realização do sequenciamento parcial do gene que codifica a VP1, considerada uma região de grande variabilidade genética (Ando *et al* 1995; Green *et al* 2000; Lopman *et al* 2002; Vinje *et al* 2004; Zheng *et al* 2006).



**Figura 7. Representação esquemática do genoma dos norovírus com as localizações das regiões mais utilizadas para a amplificação genômica.** Adaptado de Vinjé *et al* 2004.

Ensaio de amplificação quantitativa, mais especificamente o método *TaqMan*®, apresentam menor risco de contaminação em relação ao PCR convencional e são capazes de estimar o número de cópias iniciais na amostra. Essas metodologias são rápidas e, na maioria das vezes, mais sensíveis e específicas que a PCR qualitativa. Protocolos de amplificação genômica quantitativa para detecção direta de NoV GI e GII em espécimes clínicos têm permitido a detecção do vírus em amostras consideradas negativas pela ME, EIA e mesmo pela RT-PCR qualitativa (Kageyama *et al* 2003; Vainio & Myrmel 2006).

A qRT-PCR tem sido utilizada na detecção das infecções sintomáticas, pela análise de amostras provenientes de indivíduos que desenvolveram a doença, e assintomáticas, em estudos de coorte e na detecção do vírus em indivíduos excretadores assintomáticos, já que o genoma viral pode ser detectado nas fezes até 28 dias depois do início da infecção, mesmo que a excreção se reduza durante a fase convalescente da doença (Chavez-Tapia & Uribe 2009). Essa técnica é indispensável na detecção das partículas virais em substratos ambientais e em alimentos (Ngazoa *et al* 2008; Fumian *et al* 2009).

Protocolos de rotina estão sendo utilizados nos laboratórios governamentais como a Administração de Alimentos e Fármacos (*Food and Drugs Administration*, FDA) dos Estados Unidos, para detectar NoV por RT-PCR em ostras e moluscos. No entanto, ainda não estão disponíveis métodos de rotina para detectar o vírus em outros



alimentos, devido à presença de inibidores da PCR e à natureza variável dos diferentes alimentos, que afeta a concentração e extração do vírus (Shieh *et al* 2000).

### **1.7. Imunidade contra Norovirus e susceptibilidade à infecção.**

Rockx e colaboradores (2005) evidenciaram uma resposta imune com produção de anticorpos das classes G (IgG) e A (IgA) que forneciam imunidade protetora de curta duração. O pico no título de anticorpos IgM e IgA no soro foi detectado no 12º dia pós-infecção (p.i), diminuindo cerca de 40 a 60 dias p.i, respectivamente, e persistindo por um longo período em baixas concentrações.

Estudos mostram que a detecção de IgA nas fezes e no leite materno no 18º dia posterior à infecção, apresentam reatividade cruzada entre genótipos do mesmo e de diferentes genogrupos. Esta IgA, quando ingerida pelo filho, fornece imunidade protetora heterotípica contra certos genótipos dos NoVs (Iritani *et al* 2007; Makita *et al* 2007).

A IgG sérica atinge o pico de concentração após os primeiros 18 dias persistindo por um longo período em altas concentrações. Esta IgG sérica tem alto título para os NoVs do tipo homólogo ao da infecção e baixo título para os outros genótipos do mesmo genogrupo não sendo observada reação cruzada com NoV de outro genogrupo (Iritani *et al* 2007). Também é evidenciado um aumento significativo na secreção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2) incrementando a ativação de macrófagos e a produção de subclasses de IgG que favorecem a opsonização viral (Lindesmith *et al* 2005).

Os fatores genéticos e a imunidade adquirida estão envolvidos na resistência à infecção por NoV. Baseados nos dados de experimentação com humanos voluntários, estudos têm demonstrado que a imunidade contra o NoV não é duradoura e que, provavelmente, seja específica para uma estirpe em particular (Parrino *et al* 1977; Lindesmith *et al* 2008; Lindesmith *et al* 2010).

Vários estudos têm indicado que os antígenos de histocompatibilidade (*Histo-Blood Group Antigens* - HBGA) funcionam como receptores e co-receptores para uma infecção produtiva por NoV; apesar de não existir evidência direta que mostre que a união do vírus com os HBGAs intervenha para a entrada na célula hospedeira (Hutson *et al* 2002; Hennessy *et al* 2003; Lindesmith *et al* 2003; Rockx *et al* 2005).

Existe uma correlação entre a expressão polimórfica dos HBGAs e a susceptibilidade humana à infecção por NoV. Existem várias enzimas importantes na síntese dos HBGAs, incluída a fucosil transferase 2 (FUT-2). A geração de mutações no gene que as codifica levaria à produção de uma enzima não funcional e a expressão polimórfica dos HBGAs se veria afetada. Nesses indivíduos, a infecção pelo NoV não seria eficiente e a pessoa se tornaria resistente à infecção (Thorven *et al* 2005; Carlsson *et al* 2009).

Assim foi indicado em estudos realizados na Ásia, Europa e nos Estados Unidos onde foram reportados padrões de resistência genética à infecção pelo vírus (Hutson *et al* 2002; Lindesmith *et al* 2003). Apesar disso, outros estudos falharam em identificar uma associação do grupo ABO de histocompatibilidade com a susceptibilidade à infecção na Nicarágua e em dois surtos diferentes ocorridos entre tropas israelenses. Por isso tudo, a incerteza sobre resistência genética e susceptibilidade à infecção ainda existe e se torna um alvo para as investigações futuras (Halperin *et al* 2008; Bucardo *et al* 2009).

### **1.8. Tratamento**

Até o momento, não foram reportados tratamentos eficazes ou intervenção contra a infecção pelo NoVs. As soluções de re-hidratação oral (TRO), que restituem os eletrólitos essenciais e os açúcares (glicose ou sucrose), devem ser administradas como terapia de primeira linha para os casos de gastroenterite leves e sem complicações. Os pacientes com desidratação grave e com intolerância aos fluidos de administração oral podem requerer hospitalização e administração de soro fisiológico via parenteral para a restituição dos nutrientes (World Health Organization 2005; Cheng *et al* 2006; Colomba *et al* 2007; Ribeiro *et al* 2008).

O tratamento com antibióticos é ineficaz nos casos de gastroenterite leve. Os agentes de anti-mobilidade (ex. difenolixilato, loperamida) não têm demonstrado redução na perda dos fluidos intestinais e deve ser evitado o uso em crianças menores de 3 anos (Li *et al* 2007).

Em vista da aparentemente crescente emergência das variantes virais, o desenvolvimento de estratégias antivirais para controlar as infecções se tornou uma questão importante na medicina e medicina veterinária. O desenvolvimento de drogas

antivirais contra os calicivirus tem se baseado na compreensão da epidemiologia, transmissão, sintomas clínicos, replicação viral e imunidade a infecções por estes vírus (Rohayem *et al* 2010).

Os potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas contra calicivírus são: as moléculas de união e internalização do vírion; os mecanismos de desencapsulamento e liberação do genoma viral; o RNA genômico viral, a estratégia antisense, usando oligonucleotídeos de DNA para hibridizar nas regiões conservadas do genoma viral, e o silenciamento pós-transcricional utilizando RNA de interferência; a tradução do genoma viral; as enzimas replicativas virais como a protease quimotripsina *like*, a RNA dependente RNA polimerase, a Proteína do vírion (VPg) e a NTPase; o ensamble do complexo de replicação e os passos pós replicativos do vírus (Rohayem *et al* 2010).

### **1.9. Prevenção e Controle**

A prevenção dos surtos de GA causados pelo NoV está baseada na identificação imediata do modo de transmissão e na interrupção da dispersão pelo controle da contaminação dos alimentos ou da fonte de água, pela higiene estrita dos profissionais de serviços de alimentação e das superfícies contaminadas, e pela redução da propagação secundária das infecções por disseminação pessoa a pessoa (Barker *et al* 2004; Gallimore *et al* 2006; Podewils *et al* 2007; Fumian *et al* 2009).

Em ambientes de cuidados com a saúde, a prevenção das infecções nosocomiais envolve a limpeza terminal e de rotina. É fundamental a atenção na higiene das mãos após o contato com o paciente ou com objetos que podem estar contaminados (Wilhelmi *et al* 2003). O uso de detergentes é pouco efetivo na eliminação da contaminação destes vírus, sendo necessária a utilização de uma solução de hipoclorito/detergente para a descontaminação de superfícies (Barker *et al* 2004). O vapor de álcool não inflamável em sistemas de CO<sub>2</sub> é utilizado nesses ambientes onde o vapor de cloro e outros compostos cáusticos poderiam danificar equipamentos médicos (Parashar *et al* 2001).

Os primeiros avanços para o desenvolvimento de uma vacina anti-NoV têm sido obtidos pela imunização de camundongos e de voluntários infectados pelo vírus. As formulações orais de VLPs expressas em plantas transgênicas utilizadas nestes estudos produziram resposta humoral nos indivíduos desafiados (Tacket 2005; LoBue *et al*

2006). Recentemente, El-Kamary et al (2010) reportaram dados clínicos de testes de fase 1, avaliando a resposta imune a uma vacina monovalente baseada em VLPs do vírus Norwalk (GI.1) administrada junto com Monofosforil lípido A (MPL) e quitosana como adjuvantes, por via intranasal. Os experimentos demonstraram uma alta segurança e eficiência da vacina na resposta imune sistêmica e de mucosa (El-Kamary *et al* 2010).

O interferon (IFN) tem sido parte do regime de tratamento padrão contra algumas doenças virais como infecção pelo vírus das hepatites B e C (Liu & Kao 2006, Foster 2010). Chang e colaboradores (2006) demonstraram que os níveis de expressão do replicon de RNA e proteínas foram reduzidos significativamente na presença de vários interferons (IFNs), incluindo IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , em forma dose-dependente em células que albergam replicons de NoV e sugerem que os IFNs poderiam ser uma opção terapêutica para a infecção por NoV.

#### **1.10. Vigilância Epidemiológica**

Nos Estados Unidos, o CDC é o órgão coordenador de duas redes nacionais de vigilância: o Sistema Nacional de Notificação de Surtos (*National Outbreak Reporting System*, NORS), que coleta dados sobre surtos de GA causados por diversos agentes nos diferentes locais do país, e a *CaliciNet*, que é uma rede de vigilância nacional onde os laboratórios de saúde pública contribuem com uma base de dados de sequências de genes provenientes de calicivírus humanos (NoVs e sapovirus), identificados em amostras clínicas dos surtos (CDC 2010).

Essas redes ajudam a encontrar relações entre os surtos, identificar a emergência de novas variantes de NoV e, no futuro, poderiam indicar o potencial de contaminação dos alimentos durante a produção e processamento através das unidades de saúde.

A *Noronet* constitui uma rede informal de cientistas com o fim de compartilhar dados virológicos, epidemiológicos e moleculares sobre os NoVs. Foi criado pela União Européia (UE), com o objetivo principal de aprofundar os conhecimentos sobre tendências geográficas e temporais na emergência e dispersão das variantes do vírus e, assim, limitar o impacto e escala das futuras epidemias (Noronet 2010b).

Como objetivo secundário, encontra-se o desenho de uma nomenclatura bem padronizada para os genótipos, variantes ou sub-linhagens existentes e emergentes do vírus. Dentro desta organização existe uma unidade, a Rede Europeia de Virus

Transmitidos por Alimentos (*Foodborne Viruses in Europe Net, FBVE*) (Noronet 2010a), que foi criada no ano 1999 como um organismo independente de virologistas e epidemiologistas de 13 países europeus e que englobou 3 projetos da UE, tendo como objetivo a vigilância e a troca de dados científicos sobre infecções virais entéricas, com foco nos NoVs. Esta rede mantém uma base de dados disponível via internet para consulta e aporte de dados e análises.

O Centro Europeu de Prevenção e Controle (ECDC), estabelecido em Estocolmo, Suécia, em 2005 como uma agência oficial da UE, tem como desafio o fortalecimento das defesas da união contra as doenças infecciosas. A missão principal é a identificação, geração de conhecimento e comunicação das ameaças atuais e emergentes à saúde da população. Nesse contexto, o programa de doenças zoonóticas e transmitidas por alimentos e água contaminada, que trata sobre 20 doenças inclusive a GA causada pelo NoV, tem a responsabilidade da vigilância, melhoramento na detecção precoce e resposta coordenada a surtos, além de acrescentar o conhecimento de prevenção e controle, e fortalecer a capacidade de pesquisa e vigilância dos países membros com a implementação de um sistema de qualidade (ECDC 2010). Todos estes centros de pesquisa provêm um serviço de referência para os laboratórios de pesquisa sobre o NoV e ajudam a troca de informação sobre o risco epidemiológico, a biologia do vírus e os métodos de prevenção e controle de surtos.

## **2. RELEVÂNCIA**

No Paraguai, a GA é um problema de saúde pública constituindo a terceira causa de mortalidade infantil. A importância epidemiológica e filogenia dos RV-A nesses casos já foi descrita, porém a prevalência dos outros vírus responsáveis pela etiologia da GA permanece desconhecida (Parra *et al* 2007; Mathers *et al* 2008; Parra 2009).

O presente trabalho representa o primeiro estudo na busca e monitoramento dos NoVs em amostras de crianças paraguaias. O estudo pretende descrever a epidemiologia de NoVs no Departamento Central do Paraguai, representado pela capital Assunção, utilizando métodos moleculares, o que contribuirá para determinar o impacto destes vírus nos casos de GA, além de gerar conhecimento sobre a diversidade genética dos NoVs circulantes na América do Sul.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Detectar e caracterizar molecularmente os NoVs em amostras fecais negativas para bactérias patogênicas e RV-A, coletadas de crianças  $\leq 5$ anos, com gastroenterite aguda, em Assunção no Departamento Central,, Paraguai, durante os anos de 2004 e 2005.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Determinar a prevalência dos NoVs em crianças paraguaias.
- Determinar a frequência de NoV por grupo etário, gênero e sazonalidade, na população de estudo.
- Determinar os genogrupos e genótipos dos NoVs circulantes durante o período de tempo estudado.
- Realizar análise filogenética dos genótipos encontrados, comparando com aqueles circulantes na América do Sul e no mundo.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. MATERIAL**

#### **4.1.1. Amostras Clínicas**

Foram inseridas neste estudo 378 amostras de fezes de crianças com até 5 anos de idade com GA, hospitalizadas ou atendidas no ambulatório do Hospital “San Roque” em Assunção, Paraguai, de janeiro de 2004 até dezembro de 2005; coletadas nos anos 2004 (n=161) e 2005 (n=217).

Todas as amostras foram previamente testadas para a detecção de RV-A e bactérias patogênicas pelas técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e coprocultura, respectivamente, e foram selecionadas para a detecção de NoV as que apresentaram resultados negativos.

A coleta das fezes foi realizada acondicionando-as em reservatórios de plástico impermeáveis e estéreis, devidamente identificados que foram posteriormente armazenados sob congelamento. As amostras foram transportadas de acordo com as normas técnicas para os Laboratórios Centrais de Saúde (LACENs) do Brasil e enviadas ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) - Laboratório de Referência Regional de Rotavíruses (LRRR) no Rio de Janeiro; junto com a documentação complementar exigida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Brasil) e pelo Ministério de Saúde Pública e Bem Estar Social (MSP-BS, Paraguai).

O estudo foi aprovado pelos comitê de ciência e comitê de ética do Instituto de Investigações em Ciências da Saúde (IICS) da Universidade Nacional de Assunção (UNA) (Parecer nº P39/08, 05/12/2008).

#### **4.1.2. Amostras Controle**

Controles positivos e negativos foram utilizados durante todos os procedimentos deste estudo. Todos os cuidados e precauções para o trabalho com métodos de amplificação genômica foram estritamente seguidos, sendo cada etapa realizada em áreas distintas. Para todos os métodos, água livre de Dnase/Rnase foi utilizada como controle negativo.

Amostras padrões de NoV GI e GII, gentilmente cedidas pelo Dr. Chris Gallimore, pesquisador do *Enteric, Respiratory and Neurological Virus Laboratory - Health Public Agency*, Colindale - Reino Unido, foram utilizadas para padronização e



estabelecimento dos protocolos de RT-PCR qualitativo. Posteriormente, uma amostra analisada e caracterizada geneticamente como NoV no LVCA-LRRR foi utilizada como controle positivo nas reações.

### **4.1.3. Soluções**

#### **4.1.3.1. Tampão TRIS/HCl/Ca<sup>++</sup> 0,01 M pH 7,2**

Tris - hidroximetil-tris-aminometano (SIGMA®)	1,21 g
Cloreto de Cálcio -CaCl <sub>2</sub> [0,0015 M] (SIGMA®)	0,02 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL.

Em um frasco Becker de 2000 mL, foram adicionados os reagentes, homogeneizados com agitador magnético e o pH 7,2 foi ajustado com ácido clorídrico (HCl) P.A. (Merck®) antes de completar o volume final em balão volumétrico de 1000 mL. A solução foi transferida um para frasco com vedação e autoclavada a 121°C por 20 minutos. Após autoclavação, a solução foi conservada a 4°C.

#### **4.1.3.2. Sílica**

Dióxido de silício- SiO <sub>2</sub> (SIGMA®)	60 g
Água destilada q.s.p.	500 mL

Em proveta de 500 mL, foram homogeneizadas a água e a sílica por inversão e a solução, sedimentada por 24 horas. Foram desprezados, por sucção, 430 mL do sobrenadante e adicionados mais 500 mL de água destilada à sílica. Após sedimentação por 5 horas, 440 mL do sobrenadante foram desprezados. O índice de hidrogênios ionizáveis foi ajustado a pH 2,0 adicionando-se 600 µL de ácido clorídrico (HCl) P.A. 37% (Merck®). A solução foi separada em frascos de cor âmbar em alíquotas de 10 mL. Foi autoclavada a 121°C por 20 minutos e estocada a 22°- 25°C.

#### **4.1.3.3. EDTA [0,2 M] pH 8,0**

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

Em um frasco Becker de 1000 mL, foram adicionados o EDTA e 300 mL de água destilada. Após homogeneização com agitador magnético, a solução foi ajustada a pH 8,0 com NaOH [1 M], transferida para um balão volumétrico de 500 mL para ajuste

do volume final. A solução foi transferida para um frasco com tampa e conservada a 22°- 25°C.

#### **4.1.3.4. Tris-HCl [0,1 M] pH 6,4**

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

Em um frasco Becker de 1000 mL os reagentes foram adicionados e homogeneizados com agitador magnético, ajustado o pH 6,4 foi alcançado adicionando-se ácido clorídrico (HCl) P.A. (Merck®). O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 1000 mL, e completado o volume final. A solução foi acondicionada em frasco com tampa e conservada a 22°- 25°C.

#### **4.1.3.5. Tampão L6**

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

Em um frasco Becker de 250 mL os reagentes foram homogeneizados com agitador magnético. A solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, o volume final completado e transferido para frasco âmbar que foi conservado a 22°- 25°C.

#### **4.1.3.6. Tampão L2**

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

Em um frasco Becker de 250 mL os reagentes foram adicionados e homogeneizados com agitador magnético. O conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 100 mL e o volume final completado. A solução final foi transferida para frasco âmbar e conservada a 22°- 25°C.

#### **4.1.3.7. Tampão tris-boro-EDTA 10X pH 8,4 (TBE)**

Tris-base (Invitrogen®)	108 g
Ácido bórico (Reagen®)	55 g
EDTA [0,5 M] pH 8, 8 (Sigma®)	40 mL

Água Milli-Q q.s.p. 1000 mL

Em um frasco Becker de 2000 mL os reagentes foram adicionados e homogeneizados com agitador magnético. O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 1000 mL, o volume final foi completado com água destilada e transferido para frasco com vedação. A solução final foi conservada a 4°C.

#### **4.1.3.8. Gel de agarose a 2%**

Agarose (Invitrogen®) 1,6 g  
Tampão TBE 0,5 X pH 8,4 (Invitrogen®) 80 mL

A agarose foi pesada e colocada em um balão Erlenmeyer e adicionados 80 mL de tampão TBE 0,5X. O Erlenmeyer foi levado ao forno de microondas por 1 minuto (em potência alta) até que a agarose fosse dissolvida, deixando resfriar até +/- 50°C. A seguir, a agarose foi colocada no suporte de gel da cuba de eletroforese, evitando a formação de bolhas.

#### **4.1.3.9. Solução de brometo de etídio**

Brometo de etídio 10 mg/mL (Invitrogen®) 15 µL  
Água destilada 300 mL

A solução de brometo de etídio foi dissolvida em água em recipiente plástico com tampa, homogeneizada suavemente em agitador magnético e conservada a 22°-25°C. A incidência direta da luz foi evitada.

#### **4.1.3.10. Etanol 75%**

Etanol P.A. 75 mL  
Água destilada 25 mL

Em uma proveta de 100 mL foram adicionados 75 mL de álcool e o volume final completado com a água destilada para 100 mL. O conteúdo foi homogeneizado por inversão, transferido para frasco com vedação e conservado a temperatura a 4°C.

#### **4.1.4. Materiais para amplificação dos ácidos nucleicos**

Os materiais utilizados nos protocolos de amplificação e sequenciamento de ácidos nucleicos são os seguintes: H<sub>2</sub>O livre de DNAase e RNAase (Invitrogen®), tampão de PCR sem MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), desoxinucleosina trifosfatos - dNTPs

(Invitrogen<sup>®</sup>) e MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen<sup>®</sup>). As enzimas utilizadas foram as seguintes: RT Superscript III<sup>™</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>), Taq DNA Polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>). Os iniciadores utilizados para a síntese de cDNA foram: pd(N)6<sup>®</sup> (Amersham Biosciences<sup>®</sup>) ou iniciadores randômicos. A lista de iniciadores utilizados nos diferentes protocolos de PCR se encontra resumida no Quadro 2.

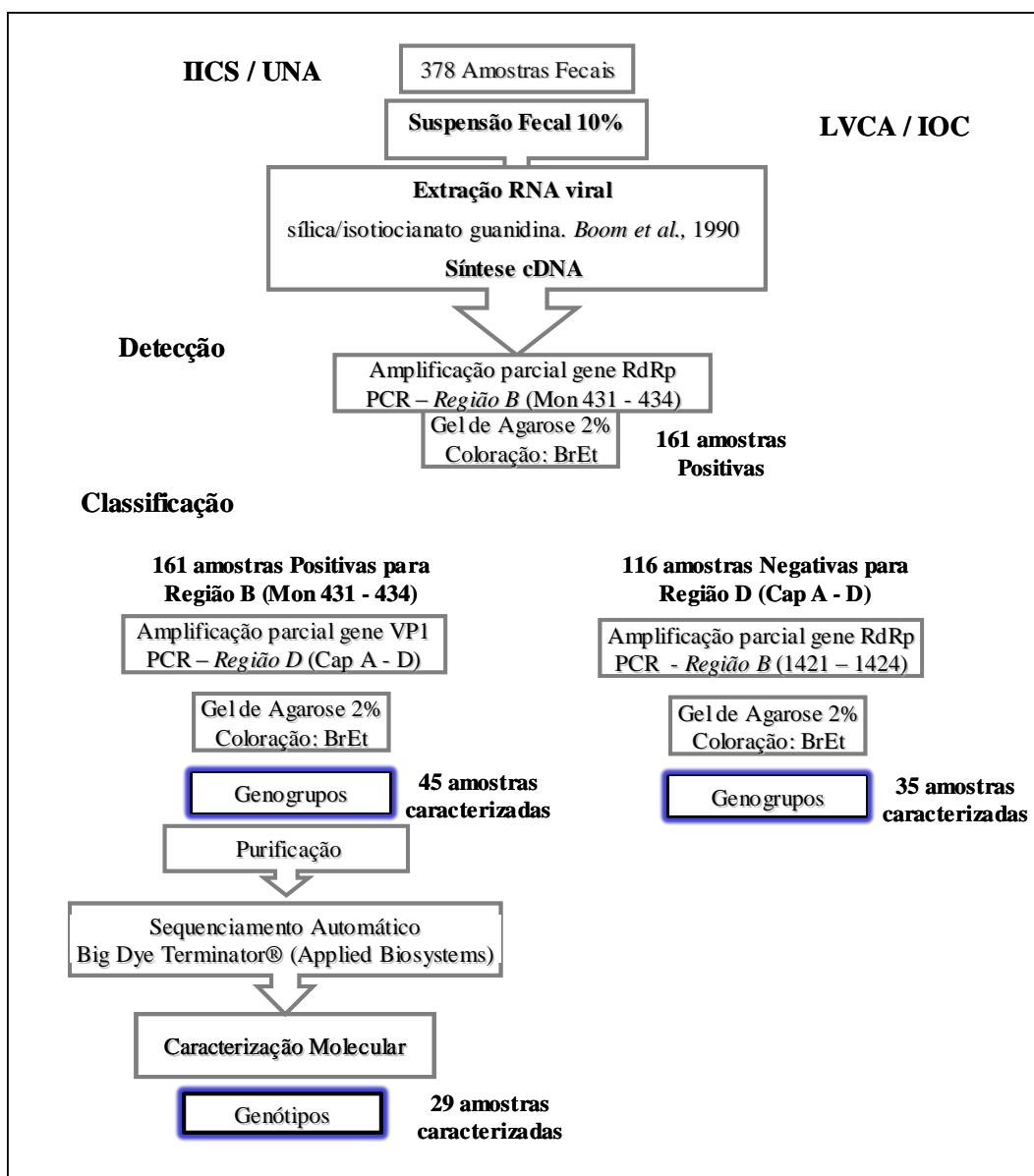
## 4.2. MÉTODOS

Todos os procedimentos para a detecção e caracterização de NoV utilizados neste estudo estão descritos a seguir. Brevemente: após a suspensão fecal das amostras recebidas, foi realizada a extração do RNA viral pelo método de isotiocianato de guanidina devido à eficiência na separação do ácido nucléico do resto do material sem ter diminuição de concentração viral; seguindo com a síntese do cDNA por RT-PCR com iniciadores randômicos.

A detecção do NoV foi realizada pela análise dos produtos da PCR utilizando os iniciadores Mon 431-434, que visam a amplificação do gene da RdRp (ORF1) mais conservada do genoma viral. Devido a isso, as amostras negativas para este protocolo foram consideradas negativas para NoV neste estudo, e as amostras positivas foram submetidas à amplificação parcial da região D do gene da VP1 (ORF2) utilizando um protocolo de PCR baseado no uso de iniciadores específicos para a identificação dos genogrupos I e II dos NoVs.

Os produtos das amostras positivas para este protocolo foram purificados e sequenciadas para a classificação em genótipos. As amostras negativas para a amplificação da ORF2, foram submetidas a um novo protocolo de detecção pela amplificação da região B do gene da RdRp, utilizando os iniciadores específicos 1421 – 1424. Após a análise dos produtos em gel de agarose 2%, os NoV encontrados nas amostras positivas são classificados em genogrupos. Na Figura 8 se ilustra o fluxograma de procedimentos.

**Figura 8: Fluxograma de procedimentos para detecção e caracterização molecular de norovírus em amostras fecais de crianças em Assunção, Paraguai.**



IICS/UNA: Instituto de Pesquisa em Ciências da Saúde-Universidade Nacional de Assunção.  
 LVCA: Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental. PCR: Reação em cadeia pela polimerase.

#### 4.2.1. Suspensão Fecal

Suspensões fecais a 10% foram preparadas em tampão Tris-HCl Ca<sup>+2</sup> [0,01 M] pH 7,2 em cabine de segurança biológica NB2 (Holten Lamin Air MS 2010, Modelo

0.9). As suspensões foram homogeneizadas, clarificadas a 3000 x *g* por 10 min a 4°C e os sobrenadantes estocados a -20°C.

#### **4.2.2. Extração do RNA Viral**

A extração do RNA viral foi realizada a partir de sobrenadantes homogeneizados e clarificados de suspensões fecais pelo método descrito por Boom e colaboradores (1990).

Em tubo plástico tipo Eppendorf® de 1,5 mL foram adicionados: 1 mL de tampão L6 e 400 µL de suspensão fecal a 10%, previamente preparada, seguido de 15 µL de sílica. Após agitação orbital por 20 minutos, as suspensões foram centrifugadas a 16.000 x *g* por 60 segundos, descartando-se o sobrenadante em solução de NaOH [10N].

Em cada tubo foi adicionado 1 mL de tampão L2, seguido de agitação em vórtex para ressuspensão do sedimento formado. Nova centrifugação foi realizada a 16.000 x *g* por 60 segundos e o sobrenadante foi descartado em solução de NaOH [10 N]. A seguir, foram realizadas duas etapas de lavagens, a primeira, adicionando-se 1 mL de etanol a 70% gelado e na segunda, adicionou-se 1 mL de acetona P.A (Merck®) gelada, utilizando-se os mesmos procedimentos de homogeneização e sedimentação anteriormente descritos, desprezando-se o sobrenadante em solução de hipoclorito de sódio a 5%.

Após a última lavagem, os tubos foram incubados a 56°C por 15 minutos com as tampas abertas para completa evaporação da acetona. Após esse período, foram adicionados 60 µL de água livre de endo e exonucleases (Invitrogen®) em cada tubo. Os tubos foram novamente homogeneizados em vórtex por 10 segundos, incubados a 56°C por 15 minutos com as tampas fechadas. Após a centrifugação a 16.000 x *g* por 3 minutos, 50 µL do sobrenadante contendo os RNAs foram coletados cuidadosamente e transferidos para outro tubo, sendo armazenados a -70°C.

#### **4.2.3. Reação de transcrição reversa para obtenção de cDNA**

A síntese do cDNA a partir do RNA extraído foi realizada utilizando-se o iniciador randômico pd[N]<sub>6</sub> (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) ou

iniciadores randômicos comerciais (Invitrogen<sup>®</sup>), sob protocolo previamente padronizado no LVCA.

Adicionou-se 2 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) a 10 µL de RNA extraído e se incubou a 97°C por 7 minutos. Colocou-se em banho de gelo por 2 minutos e após a adição de 38 µL da mistura de reagentes (RT) (**Quadro 1**), os tubos foram incubados a 42°C por 1 hora e 5°C por 10 minutos. Estocou-se o produto a 4°C até o momento da PCR.

**Quadro 1: Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa (RT) para a obtenção de cDNA de norovirus a partir do RNA viral extraído.**

Reagente	Concentração	Volume/Reação
H <sub>2</sub> O livre de DNAase / RNAase (Invitrogen <sup>®</sup> )	-	23,5 µL
Tampão de PCR sem MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen <sup>®</sup> )	10X	5,0 µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP ( Invitrogen <sup>®</sup> )	2,5 mM	4,0 µL
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen <sup>®</sup> )	50 mM	2,5 µL
RT Superscript III <sup>™</sup> (Invitrogen <sup>®</sup> )	200 U/µL	1,0 µL
pd(N)6 <sup>®</sup> (Amersham Biosciences <sup>®</sup> ) ou iniciador randômico	50 unidades (A260)	2,0 µL
<b>Volume final</b>		<b>38 µL</b>

O Quadro 2 apresenta as sequências, a localização no genoma dos iniciadores e o número de pares de bases dos produtos gerados pela técnica de reação em cadeia pela polimerase.

**Quadro 2: Iniciadores utilizados na reação em cadeia pela polimerase para amplificação do genoma de norovírus humano.**

Iniciadores	Sequência (5´- 3´) <sup>a</sup>	Orientação	Posição <sup>b</sup>	Localização	Região	Produto
<b>Iniciadores Genéricos para detecção de NoV (Beuret <i>et al.</i> 2002)</b>						
Mon431	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	+	5093 - 5112	RNA Pol <sup>c</sup>	B	213 pb
Mon432	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	+	5093 - 5112	RNA Pol	B	
Mon433	GAA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	-	5285 - 5305	RNA Pol	B	
Mon434	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	-	5285 - 5305	RNA Pol	B	
<b>Iniciadores Degenerados para classificação em Genogrupos (Vinjé <i>et al.</i> 2004)</b>						
Cap A	GGC WGT TCC CAC AGG CTT	-	6897 - 6914	VP1	D	117 pb <sup>d</sup>
Cap B2	TAT GTI GAY CCW GAC AC	+	6738 - 6754	VP1	D	
Cap B1	TAT GTT GAC CCT GAT AC	+	6738 - 6754	VP1	D	
Cap C	CCT TYC CAK WTC CCA YGG	-	6667 - 6684	VP1	D	253 pb <sup>e</sup>
Cap D3	TGY CTY ITI CCH CAR GAA TGG	+	6432 - 6452	VP1	D	
Cap D1	TGT CTR STC CCC CAG GAA TG	+	6432 - 6451	VP1	D	
<b>Iniciadores Específicos para classificação em Genogrupos (Boxman <i>et al.</i> 2006)</b>						
1421 (JV 12 Y)	ATA CCA CTA TGA TGC AGA YTA	+	4279 - 4299	RNA Pol	B	327 pb
1422 (JV 13 i)	TCA TCA TCA CCA TAG AAI GAG	-	4878 - 4858	RNA Pol	B	
1421 (JV 12 Y)	ATA CCA CTA TGA TGC AGA YTA	+	4279 - 4299	RNA Pol	B	237 pb <sup>e</sup>
1424 (Ni-R)	AGC CAG TGG GCG ATG GAA TTC	-	4515 - 4495	RNA Pol	B	
1423 (G1)	TCN GAA ATG GAT GTT GG	+	4691 - 4707	RNA Pol	B	188 pb <sup>d</sup>
1422 (JV 13 i)	TCA TCA TCA CCA TAG AAI GAG	-	4878 - 4858	RNA Pol	B	
<sup>a</sup> Código IUPAC para indicar as posições degeneradas: I: inosina, R: purina (A/G), Y: pirimidina (C/T), S: C/G, N: base indefinida <sup>b</sup> Posições baseadas nas sequências Norwalk (M87661) para NoV pos / neg e GI, e Lordsdale (X86557) para NoV GII <sup>c</sup> Pol, Polimerase <sup>d</sup> Genogrupo I, <sup>e</sup> Genogrupo II						

**4.2.4. Detecção molecular de norovirus pela técnica de reação em cadeia pela polimerase.**

Para a detecção dos NoVs foi utilizado o protocolo descrito por Beuret *et al.* (2002). Este protocolo foi modificado para otimizar a reação de PCR segundo as condições do laboratório.

A PCR genérica é baseada no uso de iniciadores degenerados para amplificação parcial do gene que codifica para a RdRp na região B (ORF1) (**Figura 7**). A reação foi realizada adicionando-se 10 µL de cDNA a 15 µL de mistura de reagentes (**Quadro 3**). Após uma etapa de desnaturação a 94°C por 3 minutos, foram realizados 40 ciclos de



amplificação de 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto, 60°C por 30 segundos e uma extensão final de 7 minutos a 72°C no termociclador - Termocicler Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA – modelo 2400. Os produtos amplificados foram estocados a 4°C até o momento da análise.

**Quadro 3: Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação do gene que codifica a RdRp do norovirus.**

Reagente	Concentração	Volume/Reação
H <sub>2</sub> O livre de DNAase / RNAase (Invitrogen®)	-	14,1 µL
Tampão de PCR sem MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen®)	10X	2,5 µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP ( Invitrogen®)	2,5 mM	2,0 µL
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen®)	50 mM	0,8 µL
Taq DNA Polimerase (Invitrogen®)	5 U/µL	0,3 µL
Mistura de iniciadores: Mon 431, Mon 432, Mon 433, Mon 434.	100 µM	0,3 µL
<b>Volume final</b>		<b>20 µL</b>

**4.2.5. Determinação dos genogrupos de Norovirus pela reação em cadeia pela polimerase (PCR - região D)**

Para a classificação nos genogrupos GI e GII foi utilizado um protocolo de PCR utilizando iniciadores degenerados que hibridizam na região D (ORF2), relativamente conservada, do gene que codifica para a maior proteína do capsídeo (VP1). O protocolo foi desenvolvido por Vinjé e colaboradores (2004), e foi descrito como apropriado para a caracterização dos genogrupos em Zheng e colaboradores (2006).

Foram realizadas duas reações diferentes: uma com iniciadores específicos para o GI e outra com iniciadores para o GII, adicionando-se 10 µL de cDNA a 40 µL da mistura de reagentes (**Quadro 4**), para volume final de 50 µL. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos e 40 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/1 minuto), hibridação dos iniciadores (44°C/1 minuto), extensão (72°C/1 minuto) e um ciclo de extensão final (72°C/10 minutos) mantendo temperatura

de 4°C por até 24 horas, no termociclador - Termocicler Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA – modelo 2400.

**Quadro 4: Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação do gene que codifica para a proteína do capsídeo (VP1).**

Reagente	Concentração	Volume/Reação
H <sub>2</sub> O livre de DNAase / RNAase (Invitrogen®)	-	26,2 µL
Tampão de PCR sem MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen®)	10X	5,0 µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP ( Invitrogen®)	2,5 mM	4,0 µL
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen®)	50 mM	1,5 µL
Taq DNA Polimerase (Invitrogen®)	5 U/µL	0,3 µL
Mistura de iniciadores: CAP A /B1/B2 (para GI) ou CAP C /D1/D3 (para GII)	100 µM	3,0 µL
<b>Volume final</b>		<b>40 µL</b>

**4.2.6. Determinação dos genogrupos de Norovirus pela reação em cadeia pela polimerase (PCR - região B)**

Para a determinação dos genogrupos nas amostras que não foram classificadas pela PCR para a região D, foi utilizado um protocolo de *Semi-Nested* PCR com iniciadores degenerados que hibridam na região B do gene que codifica para a RdRp (ORF1) (**Figura 7**). Esse protocolo foi desenvolvido por Boxman e colaboradores (2006) para a detecção de NoVs em ostras.

**4.2.6.1. Pré-amplificação da região B**

Para a reação de pré-amplificação, adicionou-se 5 µL de cDNA a 20 µL da mistura de reagentes (**Quadro 5**), para volume final de 25 µL. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e 40 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/30 segundos), hibridação dos iniciadores (45°C/30 segundos), extensão (72°C/1 minuto) e um ciclo de extensão final (72°C/10 minutos) mantendo temperatura de 10°C por até 24 horas no termociclador - Termocicler Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA – modelo 2400.

**Quadro 5: Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a pré-amplificação da Região B do gene RdRp.**

Reagente	Concentração	Volume/Reação
H <sub>2</sub> O livre de DNAase / RNAase (Invitrogen <sup>®</sup> )	-	14 µL
Tampão de PCR sem MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen <sup>®</sup> )	10X	2,5 µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP ( Invitrogen <sup>®</sup> )	2,5 mM c/u	0,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen <sup>®</sup> )	50 mM	0,8 µL
Taq DNA Polimerase (Invitrogen <sup>®</sup> )	5 U/µL	0,2 µL
Mistura de iniciadores: 1421, 1422	11 pmol/uL	2,0 µL
<b>Volume final</b>		<b>20 µL</b>

#### 4.2.6.2. Amplificação da Região B da RdRp.

Duas reações independentes específicas para a determinação dos genogrupos GI e GII foram realizadas adicionando-se 2 µL do produto da pré-amplificação a 23 µL da mistura de reagentes (**Quadro 6**), para volume final de 25 µL.

**Quadro 6: Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação da Região B do gene RdRp.**

Reagente	Concentração	Volume/Reação
H <sub>2</sub> O livre de DNAase / RNAase (Invitrogen <sup>®</sup> )	-	16,7 µL
Tampão de PCR sem MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen <sup>®</sup> )	10X	2,5 µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP ( Invitrogen <sup>®</sup> )	2,5 mM c/u	1,0 µL
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen <sup>®</sup> )	50 mM	0,6 µL
Taq DNA Polimerase (Invitrogen <sup>®</sup> )	5 U/µL	0,2 µL
Mistura de iniciadores: 1422, 1423 (para GI) e 1421, 1424 (para GII)	11 pmol/uL c/u	2,0 µL
<b>Volume final</b>		<b>23 µL</b>

As amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e 35 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/30 segundos), hibridação dos iniciadores (45°C/30 segundos), extensão (72°C/1 minuto) e um ciclo de extensão final (72°C/10 minutos) mantendo temperatura de 10°C por até 24 horas, no termociclador - Termocicler Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA – modelo 2400.

#### **4.2.7. Análise dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose**

Os produtos das PCRs, tanto para a ORF1 quanto para a ORF2, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão tris-borato-EDTA (TBE), 0,5X, a 120 V, por cerca de 1 hora; seguido de coloração com brometo de etídeo (0.4 µg/mL). Dois µL do corante azul de bromofenol 10X (0,3% azul de bromofenol, 65% sacarose, EDTA [10 mM], Tris-HCl [10 mM] pH 7,5 (Invitrogen®) foram adicionados a 10 µL do produto da PCR. Para identificar o tamanho do produto amplificado utilizou-se um padrão de tamanho molecular de 50 pb (Invitrogen®) e controles positivo e negativo da reação.

Os resultados foram visualizados com o auxílio de um transiluminador (*DyNA light dual intensity UV*; Labnet National Company) e fotografados no sistema de captura de imagem *KODAK Gel Logic 212* com o software *Kodak Molecular Imaging v.5.0.1.27*. (Carestream Health, Inc., Upland, CA).

#### **4.2.8. Sequenciamento parcial do genoma viral**

Os produtos amplificados pela PCR para a região D (ORF2) foram purificados utilizando-se o kit comercial *QIAquick® PCR purification kit* ou o *QIAquick® Gel extraction kit* (QIAGEN™, Valencia, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante, segundo a presença ou ausência de amplificados inespecíficos. Seguida à purificação, a quantidade de DNA amplificado foi determinada em espectrofotômetro *NanoDrop™* (Thermo Scientific, USA).

O sequenciamento foi realizado pela Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/Fiocruz (Otto *et al* 2008). Segundo orientação da plataforma de sequenciamento, 1-10 ng de DNA purificado e 3,2 pmoles de iniciadores utilizados na PCR foram aplicados em placa de 96 poços. A reação foi realizada utilizando o *Big Dye Terminator® v 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®, CA, USA) e os

mesmos iniciadores utilizados nas reações de amplificação genômica (**Quadro 7**), conforme recomendado pelo fabricante.

Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados com as colunas CENTRI-SEP® (Princeton Separations®, CA, USA) conforme orientação do fabricante, e os cromatogramas das sequências foram gerados utilizando o sequenciador automático de 48 capilares *ABI Prism 3730 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) da plataforma PDTIS/Fiocruz.

**Quadro 7: Reagentes utilizados na reação de sequenciamento.**

<b>Reagente</b>	<b>Volume/Reação</b>
DNA	3,5 µL
Tampão de sequenciamento (5X)	4,0 µL
Big Dye Terminator®	2,0 µL
Iniciadores	2,0 µL
H <sub>2</sub> O livre de DNAase / RNAase (Invitrogen®)	2,0 µL
<b>Volume final</b>	<b>13,5 µL</b>

**4.2.9. Análise das seqüências.**

Os cromatogramas das seqüências obtidas foram analisados com a programa *BioEdit*® versão 7.0.9.0 (Hall 1999) e as seqüências consenso de cada amostra foram geradas. O alinhamento de nucleotídeos foi realizado utilizando a ferramenta *CLUSTAL W* do programa MEGA 4.0 (Thompson *et al* 1994) .

As seqüências protótipos representantes dos diferentes genótipos de NoV de origem humana, descritas em diferentes países, foram resgatadas do *GenBank* (NCBI 2010b) através dos seus números de acesso ou mediante a utilização da ferramenta *BLAST* v2.2.24 (NCBI 2010a).

As relações filogenéticas entre as diferentes seqüências foram determinadas mediante a utilização do programa MEGA v. 4.0 através do método de reconstrução

filogenética *Neighbor-joining* (Tamura *et al* 2007). As distâncias genéticas entre as diferentes amostras foram calculadas dentro do modelo Kimura 2-parâmetros como modelo de substituição nucleotídica. A significância estatística das diferentes árvores filogenéticas obtidas (*robustness*) foi estimada através de 1.000 réplicas de *Bootstrap*.

**Quadro 8: Protótipos de norovirus de humanos resgatados do *GenBank* utilizados neste estudo.**

<b>Vírus</b>	<b>Genogrupo</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Número de acesso</b>
NoV	I	1	M87661
NoV	I	2	AJ277610
NoV	I	3	U04469
NoV	I	4	AB042808
NoV	I	5	AJ277614
NoV	I	6	AF093797
NoV	I	8	AF538679
NoV	II	1	AF414418
NoV	II	2	X81879
NoV	II	3	U02030
NoV	II	4	X56557
NoV	II	4	AY038600
NoV	II	4	AY032605
NoV	II	5	AJ277607
NoV	II	6	AJ277620
NoV	II	6	GU969057
NoV	II	7	AJ277608
NoV	II	8	AB039780
NoV	II	9	FJ874640
NoV	II	9	AY054299
NoV	II	10	AF427118
NoV	II	11	AB074893
NoV	II	12	AB067536
NoV	II	13	AY113106
NoV	II	13	AB078334
NoV	II	14	AY130761
NoV	II	15	AF542090
NoV	II	15	AY130762
NoV	II	16	AY502005
NoV	II	17	AY502009
NoV	II	18	AY823304
NoV	II	19	AY823306

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Detecção de norovírus pela reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa.

Em um período de dois anos, de janeiro de 2004 a dezembro de 2005, 927 amostras fecais procedentes de casos de GA, negativas para bactérias patogênicas sob suspeita de infecção viral, foram recebidas no Laboratório de Biologia Molecular e Genética (LBMG) do Instituto de Pesquisa em Ciências da Saúde (IICS) da Universidade Nacional de Assunção (UNA), em Assunção, Paraguai, onde foram testadas para RV-A. Foram negativas 701 amostras e 53,9% destas (378/701) foram consideradas para o presente estudo, sendo que 42,6% (161/378) foram positivas para NoV pela RT-PCR (Tabela 1) com os iniciadores Mon 431, 432, 433 e 434 (detecção), que amplificam parcialmente o gene da RdRp (ORF1). No ano 2004 a prevalência de NoV foi de 47,2 % (76/161) e no ano 2005 foi de 39,2% (85/217).

**Tabela 1: Distribuição por ano das infecções por norovirus, detectados pela reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa, em crianças paraguaias < 5 anos.**

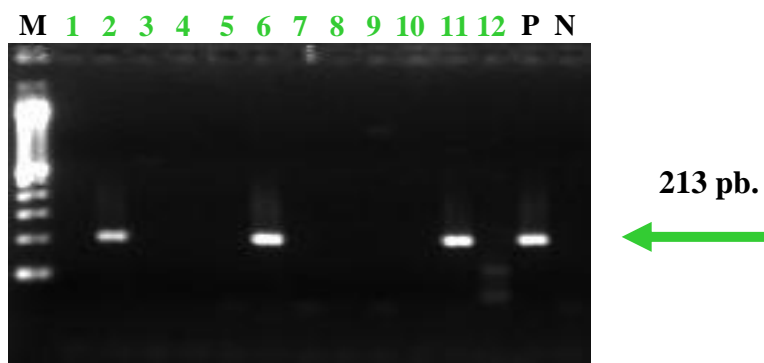
<b>Ano</b>	<b>Amostras recebidas</b>	<b>RV-A negativas</b>	<b>Amostras estudadas (%)</b>	<b>NoV positivas (%)</b>
<b>2004</b>	362	284	161 (43%)	76 (47%)
<b>2005</b>	565	417	217 (57%)	85 (52%)
<b>TOTAL</b>	<b>927</b>	<b>701</b>	<b>378</b>	<b>161</b>

NoV: norovírus; RV-A: rotavírus A

Todas as amostras positivas apresentaram o produto de amplificação específico de 213 pb pela técnica de RT-PCR para a região da RdRp, ilustrado na Figura 9.



**Figura 9: Produtos gerados pela amplificação parcial do gene da RNA polimerase RNA dependente por transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase.**



Eletoforese em gel de agarose dos produtos amplificados do gene que codifica para a RdRp dos norovírus. A seta indica o produto de 213 pb. M, marcador molecular de 100 pb.; P, controle positivo; N, controle negativo. Linhas 2, 6 e 11, amostras positivas para NoV; linhas 1, 3-5, 7-10 e 12, amostras negativas para NoV.

A distribuição dos casos positivos por gênero e faixa etária está representada na Tabela 2. As infecções por NoV foram detectadas em crianças de todos os grupos etários, sendo que a maior porcentagem dos casos positivos foi detectado nos grupos de 12 a 23 meses e de 48 a 60 meses. No entanto, a prevalência das infecções por NoV foi homogênea para todos os grupos etários.

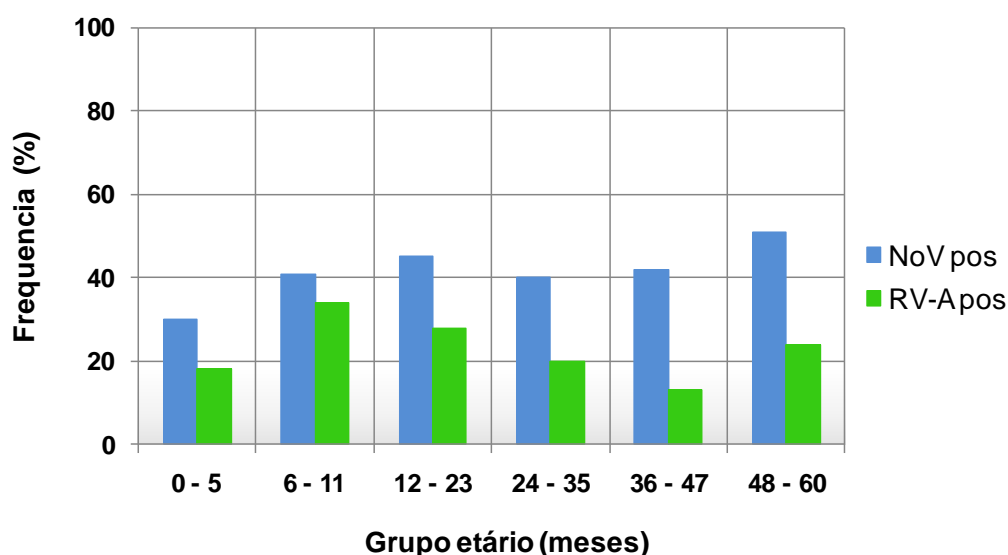
Os dados de epidemiologia molecular de RV-A em Assunção, Paraguai, para o período 2004 – 2005 foram fornecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular e Genética do IICS/UNA para análise comparativa com os dados obtidos no presente estudo. A Figura 10 ilustra a frequência da distribuição etária das infecções por NoV e RV-A nas crianças paraguaias com GA.

**Tabela 2: Distribuição por grupo etário e sexo dos casos de infecções por norovírus em crianças paraguaias com gastroenterite aguda.**

Grupo etário (meses)	Gênero				Total amostras estudadas	Total NoV pos (%)
	Feminino		Masculino			
	N° amostras estudadas	NoV pos	N° amostras estudadas	NoV pos		
0 – 5	16	3	24	9	40	12 (30)
6 – 11	30	12	28	12	58	24 (41)
12 – 23	43	17	64	31	107	48 (45)
24 – 35	23	4	37	20	60	24 (40)
36 – 47	25	11	23	9	48	20 (42)
48 – 60	31	16	34	17	65	33 (51)
<b>TOTAL</b>	<b>168 (44,4)</b>	<b>63 (37,5)</b>	<b>210 (55,6)</b>	<b>98 (46,7)</b>	<b>378</b>	<b>161 (42,6)</b>

NoV pos: positivo para norovírus.

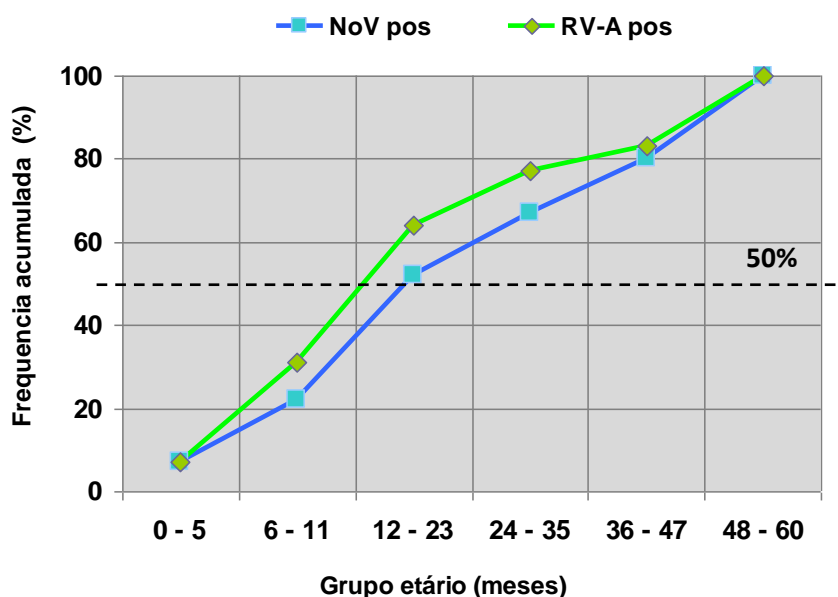
**Figura 10: Distribuição por grupo etário de casos de infecção por norovírus e rotavírus A em crianças com gastroenterite aguda, Assunção, Paraguai.**



NoV pos: positivo para norovírus; RV-A pos: positivo para rotavírus grupo A.

A distribuição de frequências acumuladas é utilizada para determinar quantos ou que proporção dos valores dos dados é menor ou maior do que certo valor. A Figura 11 representa a distribuição acumulada das infecções por RV-A e NoV ao longo dos grupos etários das crianças com GA. Foi possível observar que 50% das infecções pelo RV-A ocorreram até o primeiro ano de idade; enquanto que a mesma percentagem de infecções pelo NoV ocorreu entre o primeiro e segundo ano de idade.

**Figura 11: Percentual acumulado das infecções causadas por norovírus e rotavírus A distribuídas por grupo etário.**



NoV pos: positivo para norovírus; RV-A pos: positivo para rotavírus A.

## 5.2. Distribuição mensal das infecções por norovírus de humanos (NoV).

Os casos positivos de infecção por NoV foram observados ao longo dos anos 2004 e 2005, com distribuição relativamente homogênea. No entanto, os índices mais elevados de detecção foram observados no período de março, maio, julho e setembro/2004; e janeiro, junho e outubro-dezembro/2005; com valores superiores a 50%. A Figura 12 apresenta a distribuição mensal dos casos de GA causados por NoV na população estudada.

A Figura 13 apresenta as distribuições mensais dos casos de GA causados por norovírus e rotavírus em crianças paraguaias, nos anos 2004 e 2005. Os NoV e os RV-A apresentaram padrões de distribuição dos casos positivos bem diferenciados. RV-A foi a

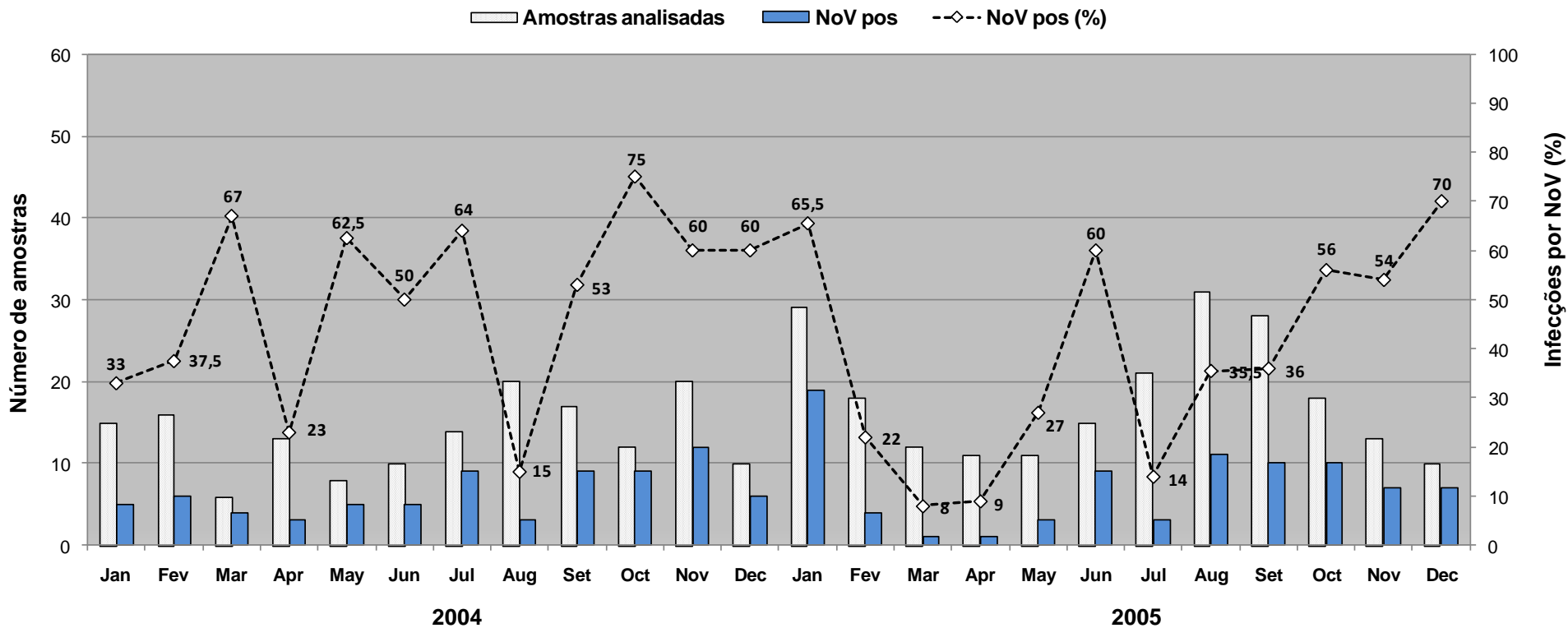
principal causa de surtos entre os meses de julho e outubro, diferente dos NoV, que apresentaram uma distribuição mais homogênea ao longo dos dois anos.

Os dados de variações climáticas mensais, tais como temperatura, umidade relativa do ar e índice pluviométrico para o município de Assunção, Paraguai, correspondentes aos anos 2004 e 2005, foram fornecidos pelo Departamento de Climatologia da Direção de Meteorologia e Hidrologia (DINAC) do Ministério da Defesa do Paraguai.

Esses dados foram relacionados com a detecção de NoV nos casos de GA em crianças paraguaias < 5 anos. A Figura 14 ilustra a distribuição mensal dos valores médios de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação, durante os anos 2004 e 2008, em relação com os casos de GA analisados e os positivos para NoV.

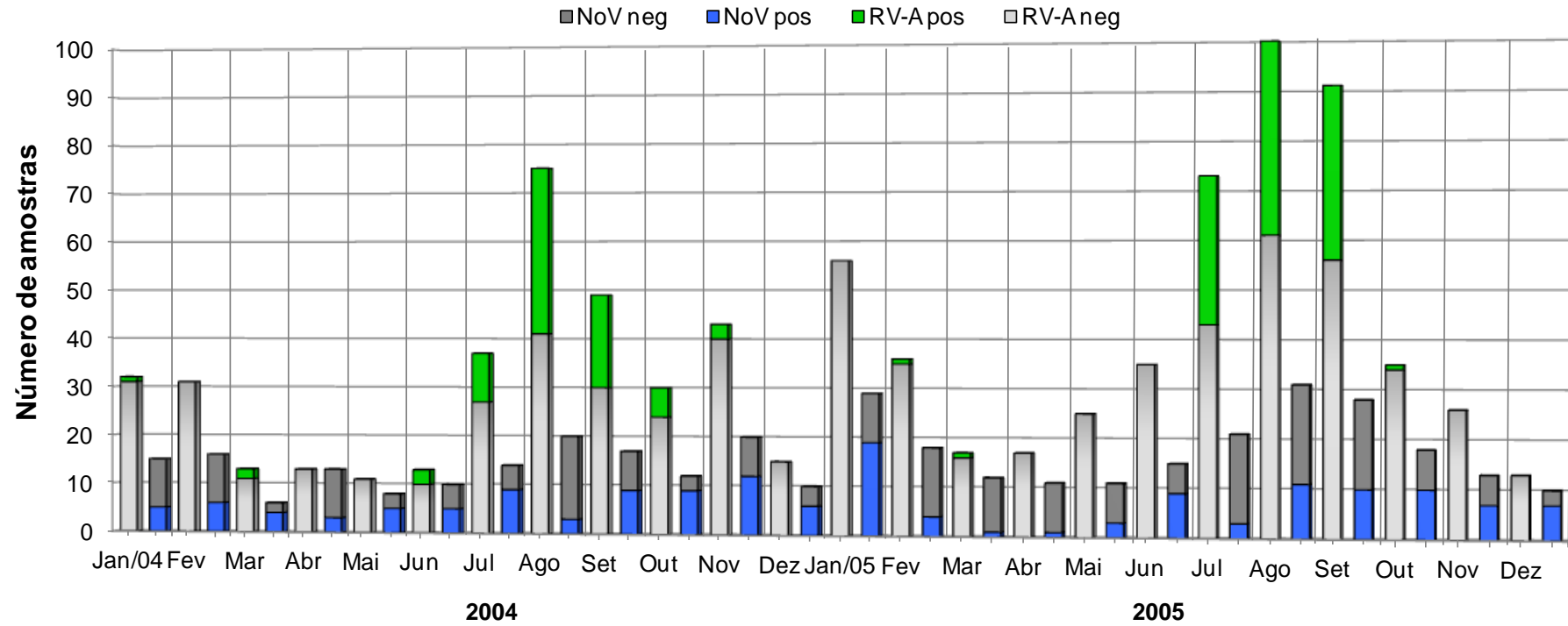
A correlação entre fatores climáticos e as taxas mensais de detecção de NoV parece não ocorrer.

Figura 12: Distribuição mensal de casos de gastroenterite aguda por norovírus em crianças de Assunção, Paraguai.



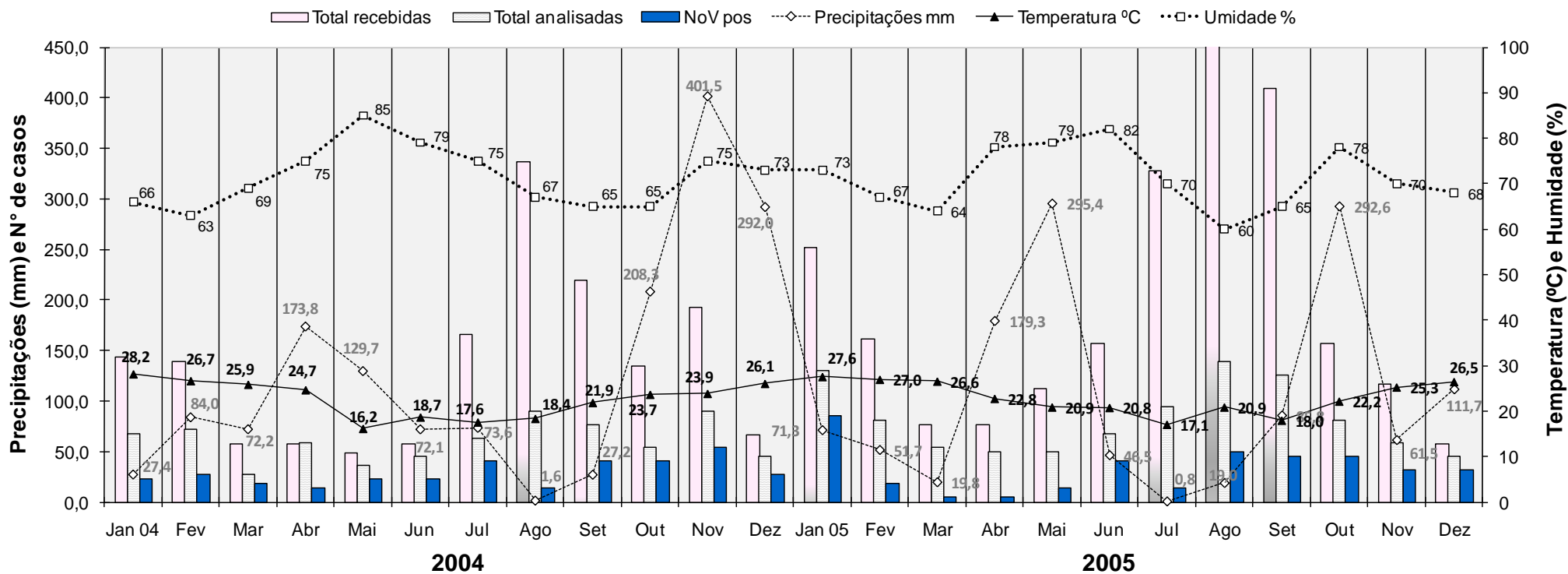
NoV pos: positivo para norovírus; NoV pos (%): porcentagem de casos positivos para norovírus.

**Figura 13: Distribuição mensal de casos de gastroenterite aguda por norovírus e rotavírus grupo A em crianças de Assunção, Paraguai.**



NoV pos e NoV neg: positivo e negativo para norovírus, respectivamente; RV-A pos e RV-A neg: positivo e negativo para rotavírus grupo A, respectivamente.

**Figura 14: Distribuição mensal de casos de gastroenterite aguda por norovírus em crianças de Assunção, Paraguai e valores médios de temperatura, umidade relativa do ar e de precipitação no município de Assunção, Paraguai, durante os anos 2004 e 2008.**



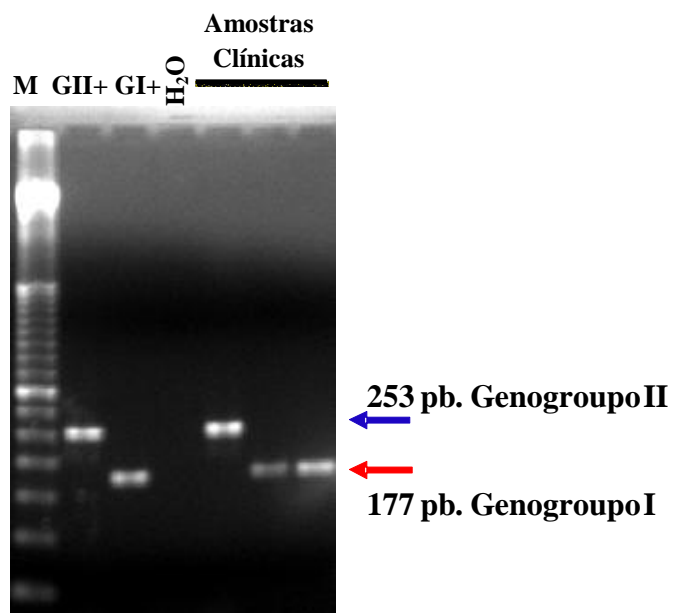
Total recebidas: amostras recebidas no Laboratório de Biologia Molecular e Genética (IICS/UNA); Total analisados: casos analisados para o presente estudo;  
NoV pos: positivo para norovírus.

### 5.3. Caracterização molecular dos norovírus detectados: determinação de genogrupos e genótipos.

A amplificação parcial do gene que codifica para a VP1 (Região D) foi realizada nas 161 amostras positivas para NoV pela técnica de RT-PCR para a região da RdRp (Mon 431-434). Deste total, 28% (45/161) amostras foram classificadas nos genogrupos I ou II. Não houve amplificação desta região (VP1) em 116 amostras (72%). A Tabela 3 apresenta a distribuição por ano das amostras positivas para NoV segundo o genogrupo e o protocolo utilizado para a classificação.

Todas as amostras que tiveram o gene que codifica para a proteína VP1 amplificado apresentaram o produto específico correspondente ao genogrupo I (177pb) ou II (253pb). A Figura 15 ilustra o gel de agarose com os produtos amplificados do gene para os NoV GI e GII.

**Figura 15: Gel de agarose com os produtos amplificados do gene que codifica para a proteína VP1 dos norovírus de diferentes genogrupos.**



M.M.: Marcador molecular de 50 pb; GII+: controle positivo genogrupo II; GI+: controle positivo genogrupo I.

As amostras negativas pelo protocolo de amplificação da região D (n=116) foram submetidas a RT-PCR para a amplificação do gene que codifica para a RdRp, na



região B do genoma viral (Figura 8, Metodologia) com os iniciadores 1421 – 1424, em 30% (35/116) delas o genogrupo foi determinado. A utilização de duas metodologias diferentes de RT-PCR para a caracterização molecular permitiu a classificação de 50% (80/161) das amostras positivas para NoV, sendo 42,5% (34/80) pertencente ao GI e 57,5% (46/80) ao GII. Os resultados desta caracterização estão resumidos na Tabela 3.

**Tabela 3: Distribuição por ano de estudo das amostras positivas para norovírus e genogrupos I e II, segundo o protocolo de amplificação genômica utilizado para a classificação.**

Ano	NoV Pos	PCR região D (VP1) n=161		Região D Neg	PCR região B (RdRp) n=116		Total Classificadas n= 161
		GI (%)	GI (%)		GI (%)	GI (%)	
<b>2004</b>	76	6 (8)	15 (20)	55	12 (22)	6 (11)	39 / 76 (51)
<b>2005</b>	85	9 (10)	15 (18)	61	7 (11)	10 (16)	41 / 85 (48)
<b>TOTAL</b>	<b>161</b>	<b>15 (9)</b>	<b>30 (19)</b>	<b>116</b>	<b>19 (16,4)</b>	<b>16 (13,8)</b>	<b>80 / 161 (50)</b>

NoV pos: positivo para norovírus; VP1: proteína viral 1 do capsídeo; Região D Neg: negativo na PCR região D; RdRp: RNA polimerase dependente de RNA. GI: genogrupo I; GII: genogrupo II.

A região B do genoma dos NoVs não possui variabilidade suficiente para permitir a classificação correta nos diferentes genótipos, o sequenciamento parcial do genoma foi realizado em 28% (45/161) dos NoV classificados como GI ou GII na RT-PCR para o gene que codifica para a proteína VP1. Das amostras sequenciadas (n=45), os cromatogramas foram considerados adequados em 29 e estas amostras puderam ser analisadas pelo programa BLAST para a determinação dos genótipos. Treze amostras foram classificadas como GI/GII indefinidas, já que o sequenciamento não gerou cromatogramas adequados para análise e 3 amostras não puderam ser classificadas em nenhum genótipo, apesar de terem apresentado boas sequências.

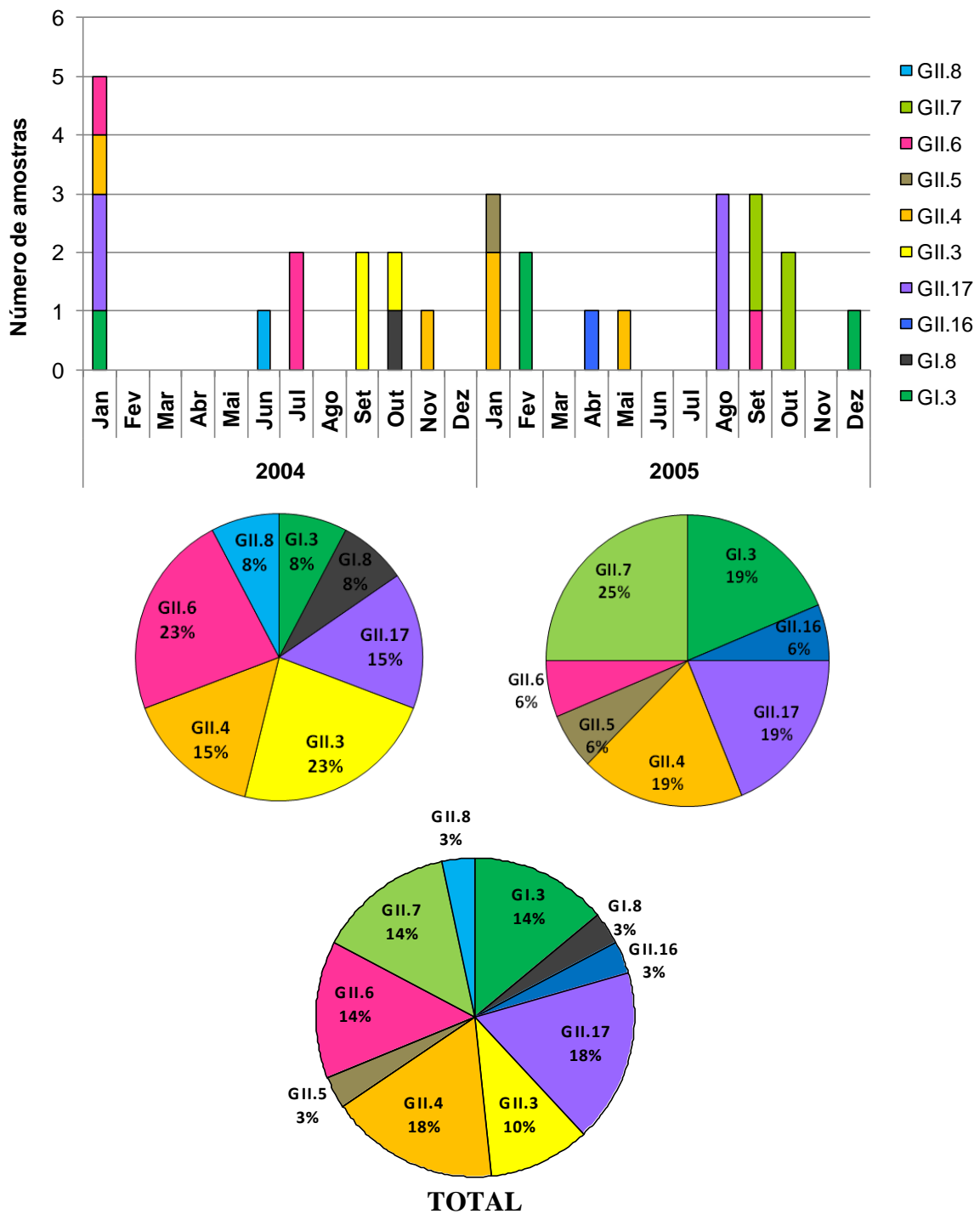
Na Tabela 4 estão representados os genogrupos e genótipos circulantes em Assunção, Paraguai, durante os anos 2004 e 2005, em crianças de até 5 anos de idade. A Figura 16 ilustra a distribuição destes genótipos no período de estudo.

**Tabela 4: Genótipos de norovírus detectados em Assunção, Paraguai dos anos 2004 - 2005.**

<b>Genogrupos e Genótipos detectados</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>Nº de Amostras (%)</b>
GI.3	1	3	4 (9)
GI.8	1	0	1 (2)
GII.3	3	0	3 (7)
GII.4	2	3	5 (11)
GII.5	0	1	1 (2)
GII.6	3	1	4 (9)
GII.7	0	4	4 (9)
GII.8	1	0	1 (2)
GII.16	0	1	1 (2)
GII.17	2	3	5 (11)
<b>GI/GII indefinido</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>16 (36)</b>
<b>TOTAL sequenciados</b>	<b>21</b>	<b>24</b>	<b>45</b>
GI.X	12	7	19
GII.X	6	10	16
<b>TOTAL caracterizados</b>	<b>39</b>	<b>41</b>	<b>80</b>

GI.X e GII.X: amostras classificadas em genogrupos (GI ou GII) pela RT-PCR para o gene da RdRp, sem sequenciamento. GI/GII indefinido: amostras sequenciadas que não puderam ser classificadas em genótipos.

**Figura 16: Distribuição mensal e frequências anuais e total dos genótipos de norovírus detectados em Assunção, Paraguai nos anos 2004 - 2005.**

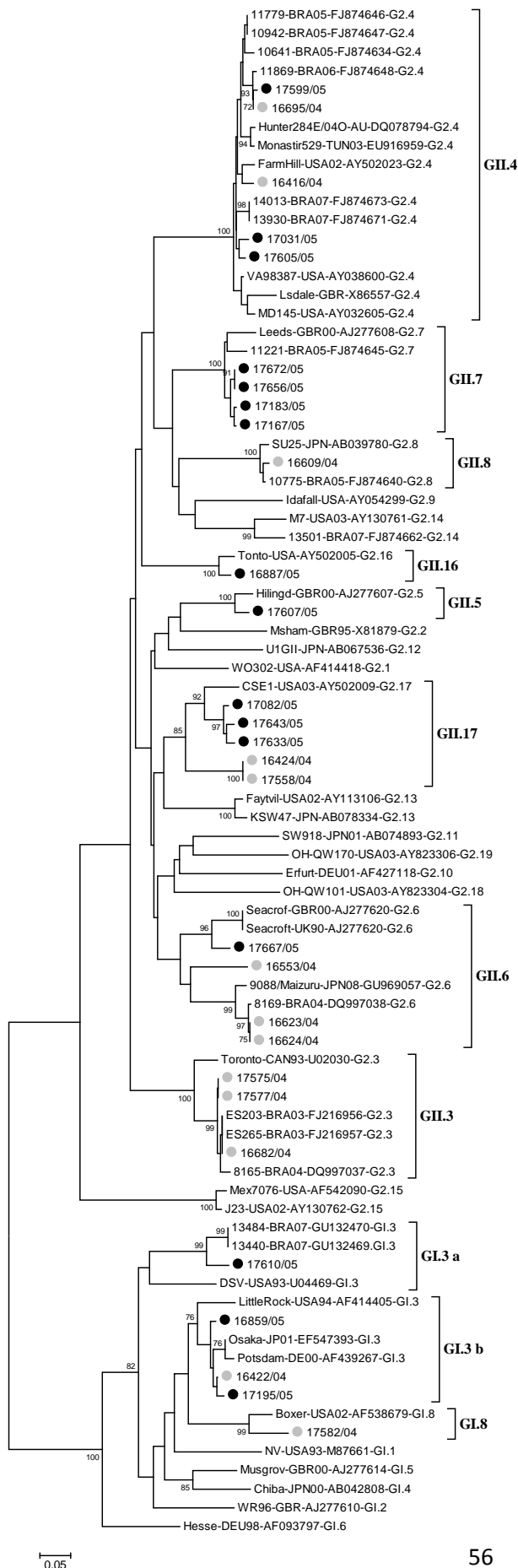


Com o objetivo de inferir sobre a origem dos diferentes genótipos dos NoV detectados neste estudo, foram realizadas análises filogenéticas utilizando sequências de protótipos e de amostras provenientes de diferentes países. As sequências dos protótipos

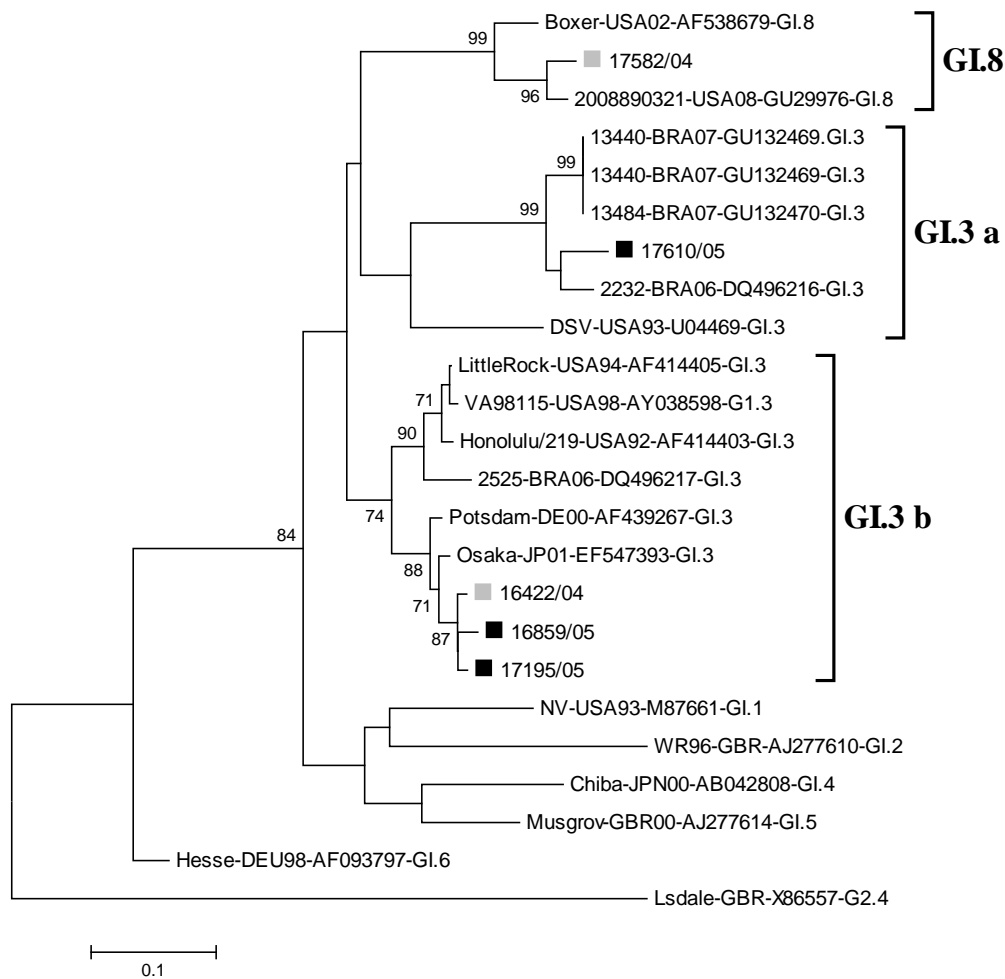
foram obtidas da base de dados “GenBank” e os números de acesso descritos no Quadro 8, no item 4.2.9 do tópico Materiais e Métodos.

As árvores filogenéticas foram obtidas analisando a sequência parcial do gene que codifica para a proteína VP1 e construídas usando o método de *Neighbor-Joining* para a reconstrução filogenética baseado no modelo Kimura 2-parâmetros para a substituição de aminoácidos, com *Bootstrap* de 1000 replicas.

Vinte e nove amostras foram caracterizadas molecularmente com sucesso. Cinco amostras foram classificadas no GI, das quais 4 foram identificadas como genótipo GI.3 e 1 como GI.8. Entre as amostras classificadas no GII (n=24), os genótipos GII.3, 4, 5, 6, 7, 8, 16 e 17 foram identificados. As Figuras 17, 18 e 19 apresentam as relações filogenéticas entre as estirpes paraguaias e os protótipos, em comparação com amostras de outros países.

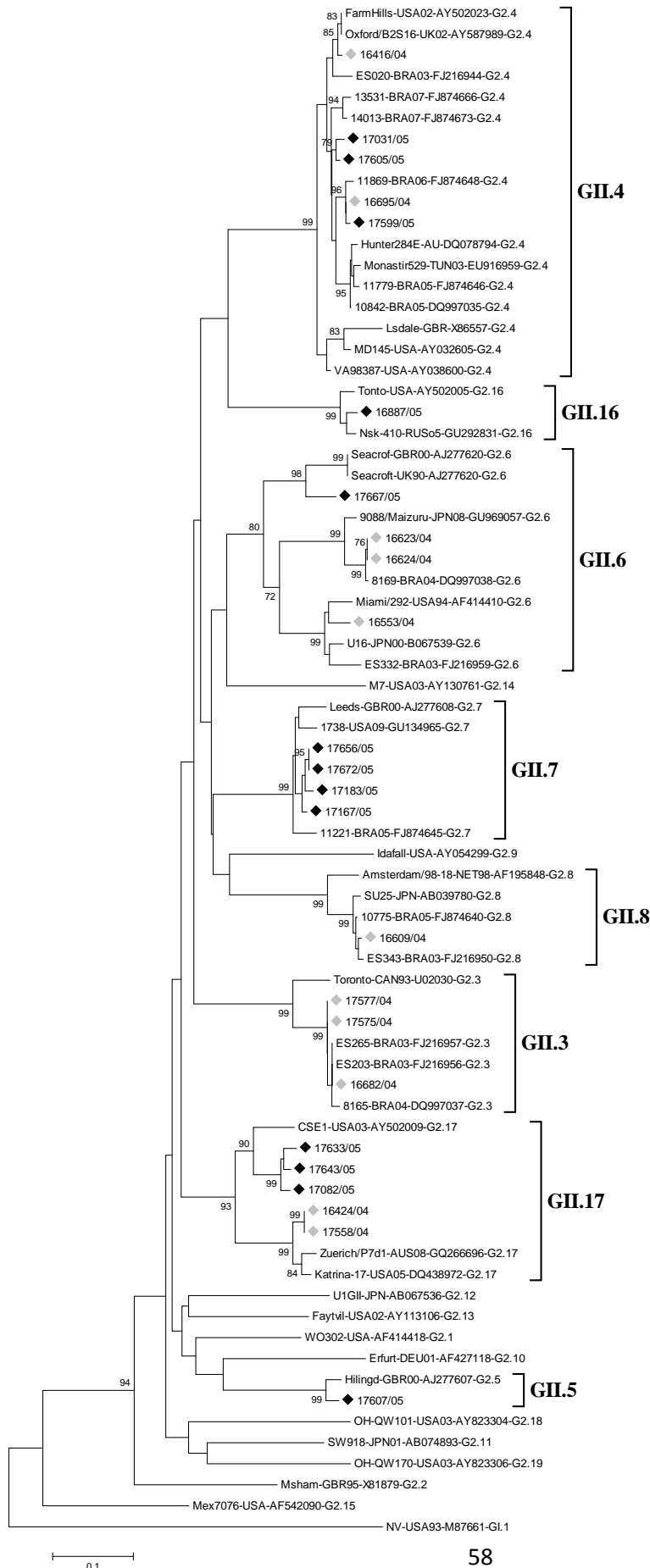


**Figura 17: Relações filogenéticas baseadas na região D do gene da VP1 mostrando as estirpes paraguaias e os protótipos de NoV. Os pontos indicam as estirpes paraguaias dos anos 2004 (cinza) e 2005 (preto). A árvore filogenética foi construída usando o modelo de substituição de aminoácidos Kimura 2-parâmetros e o método de *Neighbor-Joining* para a reconstrução filogenética, com *Bootstrap* de 1050 replicas. Valores de *Bootstrap* >70 são exibidos nos nodos.**



**Figura 18: Relações filogenéticas baseadas na região D do gene da VP1 mostrando as estirpes paraguaias e os protótipos do GI de NoV. Os quadrados indicam as estirpes paraguaias dos anos 2004 (cinza) e 2005 (preto). A árvore filogenética foi construída usando o modelo de substituição de aminoácidos Kimura 2-parâmetros e o método de *Neighbor-Joining* para a reconstrução filogenética, com *Bootstrap* de 1050 replicas. Valores de *Bootstrap* >70 são exibidos nos nodos.**

**Figura 19: Relações filogenéticas baseadas na região D do gene da VP1 mostrando as estirpes paraguaias e os protótipos do GII de NoV. Os diamantes indicam as estirpes paraguaias dos anos 2004 (cinza) e 2005 (preto). A árvore filogenética foi construída usando o modelo de substituição de aminoácidos Kimura 2-parâmetros e o método de *Neighbor-Joining* para a reconstrução filogenética, com *Bootstrap* de 1050 replicas. Valores de *Bootstrap* >70 são exibidos nos nodos.**



## 6. DISCUSSÃO

No Paraguai, a GA é uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade em crianças menores de 5 anos de idade, segundo relatórios da Direção Geral de Planejamento e Avaliação (DINAC). Portanto, a vigilância dos patógenos responsáveis por esta doença é considerada essencial para o entendimento da biologia dos mesmos, para o desenvolvimento de medidas de prevenção e o controle de surtos. Seguindo essa premissa, vários estudos foram realizados visando determinar a prevalência dos vírus como causa das GA não bacterianas na população paraguaia (Coluchi *et al* 2002; Candia *et al* 2003; Parra *et al* 2004).

Os primeiros relatos sobre as GA de etiologia viral no Paraguai datam de 1997 e reportam a incidência, sintomas clínicos e a detecção e caracterização molecular dos RV-A em crianças hospitalizadas (Coluchi *et al* 2002; Candia *et al* 2003). Posteriormente, casos de GA por RV-A foram descritos em adultos e o padrão epidemiológico e a diversidade de genótipos circulantes no Paraguai foram determinados (Martinez *et al* 2005; Parra *et al* 2005; Amarilla *et al* 2007; Parra *et al* 2007). Recentemente, Parra (2009), apresentou uma revisão dos resultados epidemiológicos de sete anos (1998 a 2005), onde descreve os RV-A como responsáveis por 26% (469/1836) dos casos de GA neste período. Esses dados, em consequência, evidenciam a ausência de determinação da etiologia em 74% dos casos de GA não bacterianas (Parra 2009).

Até o momento, não se logrou êxito no isolamento em cultura celular ou desenvolvimento de um modelo animal que reproduza as infecções por NoVs. Por esse motivo, os testes moleculares tornaram-se os principais métodos para a detecção e caracterização desses vírus (Vinje *et al* 2004; Boxman *et al* 2006; Xerry *et al* 2010).

Fankhauser e colaboradores (2002) evidenciaram que 93% dos surtos de GA não bacteriana tem os NoV como agente etiológico. Nesse estudo foram analisados, por RT-PCR e ME direta, 284 casos de GA não bacteriana provenientes de surtos que tinham sido reportados ao CDC. O modo mais comum da transmissão nesses casos foi pela contaminação dos alimentos nos restaurantes e estabelecimentos de alimentação (Fankhauser *et al* 2002).



O presente estudo representa o primeiro relato dos NoV como responsáveis pela GA na população paraguaia e, além disto, descreve a epidemiologia molecular desses vírus nesta população. Devido à alta variabilidade genética dos NoVs, inicialmente as amostras foram analisadas utilizando um protocolo de RT-PCR que amplifica regiões altamente conservadas da RdRp (Região B) dos NoV. Este protocolo de RT-PCR é o de eleição para a triagem de NoV, pois utiliza quatro iniciadores que detectam, simultaneamente, os genogrupos GI e GII (Parashar *et al* 2004; Zheng *et al* 2006).

Com este protocolo, foram detectadas 161 (43%) amostras positivas para NoV no período estudado. Nos anos 2004 e 2005, 47% (76/161) e 39% (85/217) das amostras foram positivas para NoV, respectivamente. Uma prevalência similar foi descrita por Ribeiro e colaboradores (2008), utilizando o mesmo protocolo deste estudo, quando observaram NoV em 40% (27/68) das amostras negativas para RV-A, provenientes de crianças hospitalizadas no Espírito Santo, Brasil (Ribeiro *et al* 2008). Entretanto, estes resultados devem ser analisados com cautela, como sugerido por Ribeiro, pois Lopman e colaboradores (2003b) descreveram que resultados falso positivos podem ser obtidos quando são utilizados os iniciadores que tem como alvo a ORF1 (Lopman *et al* 2003a).

Esses resultados contrastam com dados publicados sobre a prevalência dos NoV em casos esporádicos (Andreasi *et al* 2008; Bucardo *et al* 2008), pois as altas porcentagens de infecção são características de surtos (Jiang *et al* 1996; Atmar & Estes 2006; Estes *et al* 2006). Apesar disso, altas taxas de detecção (até 40%) foram descritas em casos esporádicos de NoV em outros países da América do Sul (O’Ryan *et al* 2000; Bereciartu *et al* 2002; Victoria *et al* 2007; Ribeiro *et al* 2008), assim como na Indonésia (Subekti *et al* 2002).

Apesar dos NoVs serem comumente encontrados em pessoas de todas as faixas etárias, o presente estudo foi focado em crianças com GA de até 5 anos de idade. Na população infantil paraguaia estudada, as infecções por NoV foram detectadas em crianças de todos os grupos etários, dos recém-nascidos a aqueles com 5 anos de idade. A percentagem dos casos positivos variou de 40-50% nos grupos de a partir de 6 meses de idade, sendo menor (30%) nas crianças de até 5 meses de idade.

Existem relatos indicando uma maior prevalência da infecção pelo NoV em crianças de até um ano de idade, podendo ser devido à falta de amamentação e da

proteção da imunidade passiva contra o vírus (Phan *et al* 2004; Victoria *et al* 2007). Por outro lado, uma queda na prevalência da infecção em crianças maiores de dois anos poderia estar relacionada à imunidade protetora de curta duração (Rockx *et al* 2002). Neste estudo não foi observado este tipo de comportamento, pois não houve diferença significativa na prevalência dos NoV nos diferentes grupos etários estudados, e a menor prevalência da infecção nas crianças de até 5 meses de idade pode ser devido à proteção da imunidade passiva.

A distribuição homogênea das infecções pelo NoV fica em evidência, quando comparada às infecções pelo RV-A, que apresentam maior prevalência nas populações mais jovens, com até dois anos de idade.

Analisando a percentagem acumulada da distribuição etária das infecções, foi possível observar que cerca de 50% das infecções pelo RV-A ocorreram até o primeiro ano de idade; enquanto que a mesma percentagem de infecções pelo NoV ocorreu entre o primeiro e segundo ano de idade, o que corrobora o relato de Victoria e colaboradores (2007) que evidencia um início precoce das infecções pelo NoV em crianças no Rio de Janeiro, Brasil. Estes resultados sugerem que na epidemiologia da GA no Paraguai, o NoV seria um dos patógenos mais importantes nas infecções durante os primeiros anos de vida.

Embora tenha sido observada uma diferença de 9% na taxa de detecção dos NoV em crianças do sexo masculino, esse valor não é significativo e pode ser explicado pela diferença no número de amostras coletadas para cada sexo e não como uma tendência na infecção pelo NoV.

Assunção apresenta um clima temperado e subtropical, com temperatura média anual que oscila entre 21°C-25°C. Os ciclos climáticos encontram-se bem demarcados, as temperaturas mais elevadas são detectadas durante os meses de dezembro a março (verão), com valores extremos que superam os 36°C. Esses valores, no entanto, diminuem durante os meses de junho a agosto (inverno), com mínima próxima de 0°C.

A precipitação pluviométrica no país apresenta um ciclo anual com um período de precipitações altas de outubro a março (primavera e verão) e outro com precipitações baixas nos meses de abril a setembro (inverno e primavera) (DINAC).

Apesar da presença de NoV ocorrer durante todo o ano, no hemisfério Norte as GA causadas por NoV são mais comuns no inverno e no início da primavera; enquanto que no hemisfério Sul são mais frequentes na primavera-verão (Mounts *et al* 2000; Bereciartu *et al* 2002; Lopman *et al* 2003b; Vainio & Myrmet 2006; Bucardo *et al* 2008; Verhoef *et al* 2008). No Paraguai, os casos positivos de infecção por NoV foram observados ao longo dos dois anos de estudo com distribuição relativamente homogênea.

A correlação entre fatores climáticos e as taxas mensais de detecção de NoV parece não ocorrer, não se determinando um padrão sazonal para as infecções, em contraste ao que acontece com os RV-A que, no Paraguai, apresentam uma marcada sazonalidade nos meses mais frios e secos do ano (de julho a setembro). No entanto, deve-se ressaltar que os índices mais elevados de detecção de NoV foram observados no período de março, maio, julho e setembro/2004 e janeiro, junho e outubro-dezembro/2005 com valores superiores a 50%, nos períodos de outono seco e primavera-verão.

Esses resultados são similares a aqueles descritos na literatura para esta região. Andreasi e colaboradores (2008) analisaram amostras provenientes de crianças com GA hospitalizadas em Campo Grande, MS, Brasil, entre os anos 2000 e 2004, não detectando um padrão sazonal (Andreasi *et al* 2008). Soares e colaboradores (2007), em um estudo realizado em casos de GA infantil no Rio de Janeiro, Brasil, não observou padrão sazonal para o NoV na região (Soares *et al* 2007). Por outro lado, Victoria e colaboradores (2007) observaram uma maior prevalência das infecções pelo NoV nos meses mais secos do ano em crianças hospitalizadas no Rio de Janeiro (Victoria *et al* 2007).

Para a caracterização molecular (genotipagem) das amostras positivas para NoV deste estudo, foi utilizado um protocolo de PCR baseado na amplificação do gene que codifica para a proteína VP1 do capsídeo viral (Região D). Em apenas 25% (45/161) das amostras positivas, o genogrupo pode ser identificado por esta metodologia. As 116 amostras restantes que não foram caracterizadas com este protocolo foram submetidas a um protocolo de RT-PCR (região B da ORF1 - RdRp) (**Figura 7**) com iniciadores específicos para cada genogrupo. A utilização de duas metodologias diferentes de RT-

PCR para a caracterização molecular permitiu a classificação de 50% (80/161) das amostras positivas para NoV.

Esses resultados corroboram a proposta de Vinjé et al (2004) que descrevem que a combinação de protocolos de RT-PCR para a região B (detecção) e região D (genotipagem) constitui uma estratégia adequada para as investigações de epidemiologia molecular dos NoVs (Vinje *et al* 2004). O GII foi o genogrupo prevalente (57%;46/80), seguido pelo GI (43%; 34/80).

A diversidade genética dos NoV ocorre devido ao acúmulo de mutações pontuais associadas às combinações genéticas relacionadas com a troca de sequências entre NoV similares. Isto se deve à natureza da RNA polimerase dos vírus de RNA de não apresentar atividade *proofreading* na replicação do genoma. A baixa detecção de genogrupos (região D) poderia estar relacionada à não hibridação das sequências das estirpes e dos iniciadores utilizados, devido a mutações pontuais presentes, algo que é comumente relatado para os NoVs, ou à presença de novas variantes genotípicas (Victoria *et al* 2007; Gomes *et al* 2008).

A região B do genoma dos NoVs, por ser mais conservada, não apresenta variabilidade suficiente para permitir a classificação correta dos diferentes genótipos (Fankhauser *et al* 2002) . Em decorrência disso, o sequenciamento parcial do genoma foi realizado em 28% (45/161) dos NoV positivos que foram classificados como GI ou GII na RT-PCR para o gene que codifica para a proteína VP1 do capsídeo viral (região D). Os genótipos caracterizados foram: GII.4 (18%), GII.17 (18%), GII.6 (14%), GII.7 (14%), GII.3 (10%), GII.5 (3%), GII.8 (3%), GII.16 (3%), GI.3 (14%) e GI.8 (3%).

A maior diversidade de genótipos foi encontrada no mês de janeiro do 2004, com uma co-circulação de GI.3, GII.4, GII.6 e GII.17. Genótipos menos frequentes como os GII.8, GII.3 e GI.8 foram detectados nos meses de junho, setembro e outubro no ano 2004, respectivamente, acompanhados pelos GII.6 e GII.4 nos meses de julho e novembro do mesmo ano. O ano 2005 apresentou uma diversidade de genótipos similar ao do ano anterior, já que houve co-circulação dos GII.4, GI.3, GII.17 e GII.6 nos meses de janeiro e maio, fevereiro e dezembro, agosto e setembro, respectivamente, e genótipos menos comuns: GII.5 em janeiro, GII.8 em abril e a emergência do GII.17 nos meses de setembro e outubro do 2005.

Vários estudos têm demonstrado que o genótipo GII.4 são as causas mais comuns dos surtos e casos de GA esporádicos no mundo (Bull *et al* 2010; Zheng *et al* 2010). Desde meados da década de 1990, o genótipo GII.4 tem sido responsável por 70-80% dos surtos de NoV ocorridos no mundo, principalmente devido à emergência de três variantes: Farmington Hills, Hunter e US95/96 (Bull *et al* 2006; Siebenga *et al* 2007).

Em 64% (29/45) das amostras paraguaias sequenciadas, o cromatograma encontrava-se adequado para análise pelo programa BLAST e foi possível a determinação dos genótipos. Nas amostras restantes (36%; 16/45), a sequência não estava adequada (N=13) para a análise ou a sequência estava adequada, porém não foi possível se determinar o genótipo (N=3). Essas amostras foram denominadas GI/GII indefinidas. Destas amostras, 6 (38%) haviam sido amplificadas e caracterizadas como GII e 10 (62%) caracterizadas como GI pela RT-PCR para o gene que codifica para a proteína VP1 (região D). A inviabilidade da correta caracterização pelo sequenciamento de 36% das amostras paraguaias detectadas pode ser explicada pelas variações na sequência do genoma que não permitem a amplificação com os iniciadores utilizados. Mais estudos deverão ser realizados para elucidar este tema, levando à modificação na metodologia utilizada, com o desenho de novos iniciadores.

Os resultados apresentados aqui corroboram os dados de estudos anteriores em populações diferentes que confirmam a predominância mundial do genótipo GII.4 (Bereciartu *et al* 2002; Gallimore *et al* 2004b; Victoria *et al* 2007; Ferreira *et al* 2010; Motomura *et al* 2010). Das amostras paraguaias genótipo GII.4, uma do ano 2004 foi agrupada com a variante Farmington Hills (AY502023), que tinha sido identificada no ano 2002 nos Estados Unidos, e três amostras dos anos 2004 e 2005 formaram um grupo com a variante Hunter (DQ078794), identificada na Austrália no ano 2006, demonstrando a circulação destas variantes no Paraguai. No entanto, análises complementares serão necessárias para se determinar, em nível de aminoácidos, a similaridade genética das variantes GII.4 paraguaias com aquelas variantes circulantes no mundo.

O genótipo GII.17 foi inicialmente descrito nos Estados Unidos (Zintz *et al* 2005) e, posteriormente, na Argentina (Gomes *et al* 2008) e Nicarágua (Bucardo *et al*

2008). Os genótipos GII.6 teve a primeira descrição no Brasil (Castilho *et al* 2006) e, posteriormente, os dois genótipos (GII.6 e 17) foram descritos em outros estados do Brasil (Victoria *et al* 2007; Barreira *et al* 2010; Ferreira *et al* 2010).

Deve-se mencionar que a amostra fecal contendo o NoV de genótipo GII.17 descrito na Argentina foi coletada em maio de 2005, proveniente de um surto ocorrido em Florentino Ameghino, província de Buenos Aires, em crianças e adultos. Segundo Gomes e colaboradores (2008), essa seria a primeira detecção deste genótipo na Argentina e a segunda no mundo. O GII.17 descrito na Nicarágua foi proveniente de uma amostra coletada em novembro de 2005 na cidade de León. A prevalência de 18% (5/29) do genótipo GII.17 no Paraguai sugere que a circulação deste genótipo poderá estar sendo subestimada e que a circulação do mesmo na América do Sul é anterior a aquela descrita na Argentina e na Nicarágua, pois as amostras paraguaias foram coletadas em janeiro de 2004 e a meados de 2005 (Bucardo *et al* 2008; Gomes *et al* 2008).

O segundo genótipo mais prevalente no mundo, o GII.3, foi descrito nos anos 1995 e 1996 em amostras provenientes de Mendoza, Argentina (Martinez *et al* 2002); em crianças assintomáticas de Vitória, ES, Brasil nos anos 2003 e 2004 (Barreira *et al* 2010) e em crianças sintomáticas no estado do Rio de Janeiro, Brasil, no ano 2005 (Ferreira *et al* 2010). As amostras paraguaias contendo o genótipo GII.3 foram coletadas nos meses de setembro e outubro de 2004, em crianças sintomáticas, sendo a prevalência de 10% (3/29).

O genótipo GII.7 foi detectado em quatro amostras coletadas no ano 2005 em Assunção, Paraguai, que formaram um *cluster* independente. Deve-se ressaltar que as amostras paraguaias mostraram-se distintas daquelas descritas no Brasil (Victoria *et al* 2009) e na Nicarágua (Bucardo *et al* 2008). Estudos serão necessários para determinar a diferença/semelhança entre estas estirpes da América do Sul.

O genótipo GII.8 foi descrito pela primeira vez no continente americano em 2003, em amostras de crianças assintomáticas do Brasil (Barreira *et al* 2010) e, posteriormente, em 2005 no estado do Rio de Janeiro, Brasil (Victoria *et al* 2009). No Paraguai, este genótipo foi detectado em apenas uma amostra coletada em junho de

2004, apresentando uma similaridade nucleotídica de 99% àquela descrita por Victoria *et al* (2009).

O genótipo GII.16 foi descrito na Argentina em 1995 (Martinez *et al* 2002). As amostras paraguaias deste genótipo agruparam com uma amostra do ano 2005 de Novosibirsk, Rússia (GU292831), apresentando 96% de similaridade nucleotídica.

Considerando-se que os relatos de genótipos de NoV na América Latina são ainda restritos, neste estudo foi detectada a presença do genótipo GII.5 sendo portanto, a primeira descrição deste genótipo em casos de GA na América do Sul. A amostra foi coletada em janeiro do ano 2005 e apresentou 95% similaridade nucleotídica com o protótipo (AJ277607) coletado em Hillingdon, Reino Unido, no início da década de 1990.

O genótipo GI.3 (14%; 4/29) foi o mais prevalente entre os genótipos do genogrupo I detectados. Esse genótipo foi observado nos meses de janeiro de 2004 e fevereiro e dezembro de 2005. É interessante notar que, apesar da amostra 17610/05 ter sido identificada no mesmo mês e ano que a 16859/05, a mesma encontra-se mais relacionada com amostras brasileiras dos anos 2006 e 2007, junto com o protótipo Desert Shield (U04469) que foi descrita em soldados americanos que participavam de uma operação militar em Arábia Saudita na década de 1990 (Lew *et al* 1994).

Três amostras argentinas coletadas nos anos 2004 e 2005 também foram descritas como sendo semelhantes filogeneticamente ao grupo Desert Shield. Porém, não puderam ser comparadas com a amostra paraguaia devido a ausência de sequência do gene que codifica para a proteína VP1 no GenBank (Gomes *et al* 2007; Gomes *et al* 2008). As amostras paraguaias 16422/04, 16859/05 e 17195/05, formaram um sub-grupo único junto com o protótipo Osaka (EF547393), detectada no Japão no ano 2001.

Uma amostra coletada em outubro de 2004, de uma criança com um ano de idade, foi classificada como GI.8 e apresentou 98% de similaridade nucleotídica com a amostra GU299761, descrita nos Estados Unidos no ano de 2008. Esta é a primeira descrição deste genótipo na América do Sul.

Neste estudo estão sendo descritos os primeiros relatos da presença de NoVs em casos de GA no Paraguai. A exemplo de outros relatos na América do Sul pode-se observar que existe um grande espectro de genótipos circulantes na população paraguaia. Este estudo contribui ainda para um melhor entendimento dos genótipos de NoVs circulantes na América do Sul e no mundo, permitindo uma melhor compreensão da epidemiologia molecular deste vírus, que poderá contribuir para futuros estudos com vacinas, em particular para os países em desenvolvimento.



## 7. CONCLUSÕES

- A prevalência de NoV em crianças paraguaias foi de 43% nas amostras negativas para bactérias patogênicas e RV-A nos anos de 2004 e 2005.
- A distribuição de NoV foi similar nas diferentes faixas etárias e gênero. Não foi observado um perfil sazonal definido para as infecções por NoV na população estudada.
- A percentagem acumulada da distribuição etária das infecções demonstrou que 50% das infecções ocorreram em menores de dois anos de idade.
- Os NoVs GII foram mais frequentes do que os NoVs GI (58% vs. 42%, respectivamente).
- Os genótipos GII.4 (11%) e GII.17 (11%) foram os prevalentes no período estudado.
- Os genótipos GII.5 e GI.8 estão sendo descritos pela primeira vez na América do Sul.
- Os iniciadores Cap A-D (região D) apresentam sensibilidade baixa na determinação dos genogrupos de NoV, nas amostras analisadas. Foi necessário o uso combinado de mais de um protocolo de RT-PCR, visando a amplificação de regiões diferentes do genoma viral, para a correta caracterização molecular dos NoV.

## **8. PERSPECTIVAS**

Algumas amostras GI e GII não puderam ter seus genótipos caracterizados. Assim sendo, será necessário o desenvolvimento de novos protocolos moleculares e o desenho de novos iniciadores para a genotipagem das amostras que não puderam ser classificadas em genótipos, para a amplificação parcial ou total do gene que codifica para a proteína VP1 do capsídeo, permitindo a genotipagem por sequenciamento.

Será importante também a investigação de eventuais recombinantes. Para tanto, será necessário a amplificação completa das ORF2 e 3.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Adler JL, Zickl R. 1969. Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 119:668-673
- Alfano-Sobsey E, Sweat D, Hall A, Breedlove F, Rodriguez R, Greene S, Pierce A, Sobsey M, Davies M, Ledford SL. 2011. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiol Infect* 28:1-7.
- Amarilla A, Espinola EE, Galeano ME, Farina N, Russomando G, Parra GI. 2007. Rotavirus infection in the Paraguayan population from 2004 to 2005: high incidence of rotavirus strains with short electropherotype in children and adults. *Med Sci Monit* 13:CR333-337
- Ando T, Jin Q, Gentsch JR, Monroe SS, Noel JS, et al. 1995. Epidemiologic applications of novel molecular methods to detect and differentiate small round structured viruses (Norwalk-like viruses). *J Med Virol* 47:145-152
- Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. 2000. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *J Infect Dis* 181 Suppl 2:S336-348
- Andreasi MS, Cardoso DD, Fernandes SM, Tozetti IA, Borges AM, et al. 2008. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:741-744
- Appleton H. 1987. Small round viruses: classification and role in food-borne infections. *Ciba Found Symp* 128:108-125
- Atmar RL, Estes MK. 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 14:15-37
- Atmar RL, Estes MK. 2006. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am* 35:275-290, viii
- Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. 2004. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect* 58:42-49
- Barreira DM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadovsky AD, et al. 2010. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J Clin Virol* 47:60-64
- Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, Hammer C, Garfield M, Green KY. 2003. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol* 77:10957-10974

- Bereciartu A, Bok K, Gomez J. 2002. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Virol* 25:197-203
- Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* 77:11603-11615
- Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Luthi TM. 2002. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol* 68:1925-1931
- Bioinformatics SIO. 2010. ViralZone: Norovirus. [http://www.expasy.ch/viralzone/all\\_by\\_species/194.html](http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/194.html). (18 dez 2010)
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2(7841):1281-1283.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noorda J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495-503
- Boxman IL, Tilburg JJ, Te Loeke NA, Vennema H, Jonker K, et al. 2006. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int J Food Microbiol* 108:391-396
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. 2005. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 365:1147-1152
- Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, Paniagua M, Lindgren PE, et al. 2008. Pediatric norovirus diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol* 46:2573-2580
- Bucardo F, Kindberg E, Paniagua M, Grahn A, Larson G, et al. 2009. Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua. *J Med Virol* 81:728-735
- Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. 2006. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 44:327-333
- Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, White PA. 2010. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog* 6:e1000831
- Campos GS, Moreau VH, Bandeira A, Barberino G, Almeida PF, et al. 2008. Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. *Arch Virol* 153:1125-1129

- Candia N, Parra GI, Chirico M, Velazquez G, Farina N, et al. 2003. Acute diarrhea in Paraguayan children population: detection of rotavirus electropherotypes. *Acta Virol* 47:137-140
- Cao S, Lou Z, Tan M, Chen Y, Liu Y, Zhang Z, Zhang XC, Jiang X, Li X, Rao Z. 2007. Structural Basis for the Recognition of Blood Group Trisaccharides by Norovirus. *J Virol* 81(11): 5949–5957
- Carlsson B, Kindberg E, Buesa J, Rydell GE, Lidon MF, et al. 2009. The G428A nonsense mutation in FUT2 provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 Norovirus infection. *PLoS One* 4:e5593
- Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinje J, Racz ML. 2006. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in Sao Paulo State, Brazil. *J Clin Microbiol* 44:3947-3953
- Caul EO, Appleton H. 1982. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *J Med Virol* 9:257-265
- CDC. 2003. CDC Norovirus Activity: Morbidity and Mortality Weekly Report 52:41-45
- CDC. 2010. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/>. (18 dez 2010)
- Chakravarty S, Hutson AM, Estes MK, Prasad BV. 2005. Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *J Virol* 79:554-568
- Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, King AD, Green KY. 2006. Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. *Virology* 353(2):463–473
- Chavez-Tapia NC, Uribe M. 2009. Topics in prevalent diseases : a minority's perspective. New York: Nova Biomedical Books. vi, 367 p. pp.
- Chen R, Neill JD, Noel JS, Hutson AM, Glass RI, et al. 2004. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J Virol* 78:6469-6479
- Cheng FW, Leung TF, Lai RW, Chan PK, Hon EK, Ng PC. 2006. Rapid control of norovirus gastroenteritis outbreak in an acute paediatric ward. *Acta Paediatr* 95:581-586
- Clarke SK, Cook GT, Egglestone SI, Hall TS, Miller DL, et al. 1972. A virus from epidemic vomiting disease. *Br Med J* 3:86-89

- Colomba C, Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Ramirez S, et al. 2007. Norovirus and gastroenteritis in hospitalized children, Italy. *Emerg Infect Dis* 13:1389-1391
- Coluchi N, Munford V, Manzur J, Vazquez C, Escobar M, et al. 2002. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. *J Clin Microbiol* 40:1709-1714
- Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN. 1995. Human enteric Caliciviridae: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *J Gen Virol* 76 ( Pt 9):2349-2355
- Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RF, Wyatt RG, et al. 1972. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 140:578-583
- Dolin R, Reichman RC, Roessner KD, et al. 1982. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 146:184-189.
- Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. 2008. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev* 225:190-211
- Doré B, Keaveney S, Flannery J, Rajko-Nenow P. 2010. Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February–March 2010. *Euro Surveill* 15(19):pii=19567.
- Duizer E, van Duynhoven Y, Vennema H, Koopmans M. 2004. Failure to detect norovirus in a large group of asymptomatic individuals by Marshall et al. (*Public Health* Vol 118 (3) 230-233). *Public Health* 118:455-456; author reply 456-457
- ECDC. 2010. <http://www.ecdc.europa.eu>. (nov 2010)
- Ehresmann DW, Schaffer FL. 1977. RNA synthesized in calicivirus-infected cells is atypical of picornaviruses. *J Virol* 22:572-576.
- El-Kamary SS, Pasetti MF, Mendelman PM, Frey SE, Bernstein DI, et al. 2010. Adjuvanted intranasal Norwalk virus-like particle vaccine elicits antibodies and antibody-secreting cells that express homing receptors for mucosal and peripheral lymphoid tissues. *J Infect Dis* 202:1649-1658
- EpiInfo. 2010. <http://www.cdc.gov/Epiinfo/>. (nov 2010)
- Estes MK, Kapikian AZ. 2001. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.1917-1975.

- Estes MK, Prasad BV, Atmar RL. 2006. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr Opin Infect Dis* 19:467-474
- Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, et al. 2002. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 186:1-7
- Farkas T, Sestak K, Wei C, Jiang X. 2008. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol* 82:5408-5416
- Farkas T, Cross RW, Hargitt E, 3rd, Lerche NW, Morrow AL, Sestak K. 2010. Genetic diversity and histo-blood group antigen interactions of rhesus enteric caliciviruses. *J Virol* 84:8617-8625
- Ferreira MS, Xavier MP, Fumian TM, Victoria M, Oliveira SA, et al. 2008. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. *J Med Virol* 80:338-344
- Ferreira MS, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MP, et al. 2010. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio De Janeiro, Brazil 2005-2008. *J Med Virol* 82:1442-1448
- Foster GR. 2010. Pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C: pharmacological and clinical differences between peginterferon-alpha-2a and peginterferon-alpha-2b. *Drugs* 70(2):147-165
- Friesema IH, Vennema H, Heijne JC, de Jager CM, Morroy G, et al. 2009. Norovirus outbreaks in nursing homes: the evaluation of infection control measures. *Epidemiol Infect* 137:1722-1733
- Fumian TM, Leite JP, Marin VA, Miagostovich MP. 2009. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. *J Virol Methods* 155:39-43
- Gabbay YB, Glass RI, Monroe SS. 1994. Prevalence of antibodies to Norwalk virus among Amerindians in isolated Amazonian communities. *Am J Epidemiol* 139:728-733
- Gallimore CI, Cubitt DW, Richards AF, Gray JJ. 2004a. Diversity of enteric viruses detected in patients with gastroenteritis in a tertiary referral paediatric hospital. *J Med Virol* 73:443-449
- Gallimore CI, Green J, Richards AF, Cotterill H, Curry A, et al. 2004b. Methods for the detection and characterisation of noroviruses associated with outbreaks of gastroenteritis: outbreaks occurring in the north-west of England during two norovirus seasons. *J Med Virol* 73:280-288

- Gallimore CI, Barreiros MA, Brown DW, Nascimento JP, Leite JP. 2004c. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 37:321-326
- Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, et al. 2006. Environmental monitoring for gastroenteric viruses in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J Clin Microbiol* 44:395-399
- Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparac-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. 2000a. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 74:6581-6591
- Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, et al. 2000b. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 181 Suppl 2:S254-261
- Gomes KA, Stupka JA, Gomez J, Parra GI. 2007. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. *J Med Virol* 79:1703-1709
- Gomes KA, Stupka JA, Diana A, Parra GI. 2008. [Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis occurring in Argentina during 2005 and 2006]. *Rev Argent Microbiol* 40:222-228
- Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, et al. 2005. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep* 6:968-972
- Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, et al. 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 181 Suppl 2:S322-330
- Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. 2007. Human caliciviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 949–980.
- Green KY, Belliot G, Taylor JL, Valdesuso J, Lew JF, et al. 2002. A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *J Infect Dis* 185:133-146
- Greenberg HB, Valdesuso JR, Kalica AR, Wyatt RG, McAuliffe VJ, et al. 1981. Proteins of Norwalk virus. *J Virol* 37:994-999
- Guix S, Asanaka M, Katayama K, Crawford SE, Neill FH, et al. 2007. Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J Virol* 81:12238-12248



- Guo M, Chang KO, Hardy ME, Zhang Q, Parwani AV, Saif LJ. 1999. Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to Sapporo-like human caliciviruses. *J Virol* 73:9625–9631
- Guo M, Evermann JF, Saif LJ. 2001. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. *Arch Virol* 146:479–493
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98
- Halperin T, Vennema H, Koopmans M, Kahila Bar-Gal G, Kayouf R, et al. 2008. No association between histo-blood group antigens and susceptibility to clinical infections with genogroup II norovirus. *J Infect Dis* 197:63-65
- Hansman GS, Takeda N, Katayama K, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. 2006. Genetic diversity of sapovirus in children, Australia. *Emerg Infect Dis* 12:141–143
- Hansman GS, Saito H, Shibata C, Ishizuka S, Oseto M, Oka T, Takeda N. 2007a. Outbreak of gastroenteritis due to sapovirus. *J Clin Microbiol* 45:1347–1349
- Hansman GS, Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Oka T, Takeda N. 2007b. Recombinant sapovirus gastroenteritis, Japan. *Emerg Infect Dis* 13:786–788
- Hardy ME. 2005. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* 253:1-8
- Harris JP, Edmunds WJ, Pebody R, Brown DW, Lopman BA. 2008. Deaths from norovirus among the elderly, England and Wales. *Emerg Infect Dis* 14:1546-1552
- Harris JP, Lopman BA, O'Brien SJ. 2010. Infection control measures for norovirus: a systematic review of outbreaks in semi-enclosed settings. *J Hosp Infect* 74:1-9
- Hennessy EP, Green AD, Connor MP, Darby R, MacDonald P. 2003. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 188:176-177
- Hilleman MR, Werner JH. 1954. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med.* 85(1):183-188.
- Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. 2002. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 185:1335-1337
- Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. 2004. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* 12:279-287

- ICTV. 2010. International Committee for Taxonomy of Viruses. <http://www.ictvdb.org/>. (18 dez 2010)
- Ike AC, Brockmann SO, Hartelt K, Marschang RE, Contzen M, Oehme RM. 2006. Molecular epidemiology of norovirus in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany from 2001 to 2004. *J Clin Microbiol* 44:1262-1267
- Ike AC, Hartelt K, Oehme RM, Brockmann SO. 2008. Detection and characterization of sapoviruses in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany. *J Clin Virol* 43:37-41
- Iritani N, Seto Y, Kubo H, Haruki K, Ayata M, Ogura H. 2002. Prevalence of “Norwalk-like virus” infections in outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis observed during the 1999-2000 season in Osaka City, Japan. *J Med Virol* 66:131-138
- Iritani N, Seto T, Hattori H, Natori K, Takeda N, et al. 2007. Humoral immune responses against norovirus infections of children. *J Med Virol* 79:1187-1193
- Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Okui T, Katayama K, Takeda N, Oka T. 2008. Characterization of sapoviruses detected in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis* 61:504-506
- Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK. 1992a. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:2529-2534
- Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. 1992b. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 66:6527-6532
- Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. 1993. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195:51-61
- Jiang X, Turf E, Hu J, Barrett E, Dai XM, et al. 1996. Outbreaks of gastroenteritis in elderly nursing homes and retirement facilities associated with human caliciviruses. *J Med Virol* 50:335-341
- Jiang X, Wilton N, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, et al. 2000. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *J Infect Dis* 181 Suppl 2:S349-359
- Johansson PJ, Bergentoft K, Larsson PA, Magnusson G, Widell A, Thorhagen M, and Hedlund KO. 2005. A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scand J Infect Dis* 37:200-204
- Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, et al. 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

- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10:1075-1081
- Kapikian AZ. 1994. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. New York: M. Dekker. xx, 785 p. pp.
- Kapikian AZ, Estes MK, Chanock RM. 1996. Norwalk group of viruses. In *Fields virology*, ed. BNK Fields, D.M.; Howley, P.M., pp. 783-810. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins
- Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. 2002a. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol* 68:1033-1039
- Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, et al. 2002b. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 299:225-239
- Kaufman SS, Chatterjee NK, Fuschino ME, Morse DL, Morotti RA, et al. 2005. Characteristics of human calicivirus enteritis in intestinal transplant recipients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 40:328-333
- Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC, DuPont HL, Secor SL, et al. 1985. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol* 50:261-264
- Koopmans M, Vinje J, Duizer E, de Wit M, van Duynhoven Y. 2001. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in the Netherlands. *Novartis Found Symp.* 238:197-218.
- Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. 1993. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 259:516-519
- La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Muscillo M. 2008. Detection of genogroup IV Noroviruses in environmental and clinical samples and partial sequencing through rapid amplification of cDNA ends. *Arch Virol* 153:2077-2083
- Leite JP, Ando T, Noel JS, Jiang B, Humphrey CD, et al. 1996. Characterization of Toronto virus capsid protein expressed in baculovirus. *Arch Virol* 141:865-875
- Lew JF, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, Green KY. 1994. Molecular characterization and expression of the capsid protein of a Norwalk-like virus recovered from a Desert Shield troop with gastroenteritis. *Virology* 200:319-325

- L'Homme Y, Sansregret R, Plante-Fortier E, Lamontagne AM, Lacroix G, Ouardani M, Deschamps J, Simard G, Simard C. 2009. Genetic diversity of porcine Norovirus and Sapovirus: Canada, 2005–2007. *Arch Virol* 154:581–593
- Li ST, Grossman DC, Cummings P. 2007. Loperamide therapy for acute diarrhea in children: systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 4:e98
- Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, et al. 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 9:548-553
- Lindesmith L, Moe C, Lependu J, Frelinger JA, Treanor J, Baric RS. 2005. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *J Virol* 79:2900-2909
- Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, et al. 2008. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* 5:e31
- Lindesmith LC, Donaldson E, Leon J, Moe CL, Frelinger JA, et al. 2010. Heterotypic humoral and cellular immune responses following Norwalk virus infection. *J Virol* 84:1800-1815
- Liu CJ, Kao JH. 2006. Pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis B. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 1(1):85–94
- LoBue AD, Lindesmith L, Yount B, Harrington PR, Thompson JM, et al. 2006. Multivalent norovirus vaccines induce strong mucosal and systemic blocking antibodies against multiple strains. *Vaccine* 24:5220-5234
- Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, et al. 2004a. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 363:682-688
- Lopman BA, Brown DW, Koopmans M. 2002. Human caliciviruses in Europe. *J Clin Virol* 24:137-160
- Lopman BA, Reacher M, Gallimore C, Adak GK, Gray JJ, Brown DW. 2003a. A summertime peak of "winter vomiting disease": surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. *BMC Public Health* 3:13
- Lopman BA, Adak GK, Reacher MH, Brown DW. 2003b. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerg Infect Dis* 9:71-77
- Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. 2004b. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis* 39:318-324

- Makita K, Hayakawa Y, Okame M, Homma K, Phan TG, et al. 2007. First detection of IgA against norovirus in breast milk. *Clin Lab* 53:125-128
- Madeley CR, Cosgrove BP. 1975. Viruses in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2:124-197
- Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, Huang P, Jiang X, Le Pendu J. 2002. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122:1967–1977.
- Martella V, Campolo M, Lorusso E, Cavicchio P, Camero M, et al. 2007. Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). *Emerg Infect Dis* 13:1071-1073
- Martella V, Lorusso E, Decaro N, Elia G, Radogna A, et al. 2008a. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg Infect Dis* 14:1306-1308
- Martella V, Colombrita D, Lorusso E, Draghin E, Fiorentini S, et al. 2008b. Detection of a porcine-like rotavirus in a child with enteritis in Italy. *J Clin Microbiol* 46:3501-3507
- Martella V, Lorusso E, Banyai K, Decaro N, Corrente M, Elia G, Cavalli A, Radogna A, Constantini V, Saif LJ, Lavazza A, Di Trani L, Bounavoglia C. 2008c. Identification of a porcine calicivirus related genetically to human sapoviruses. *J Clin Microbiol* 46:1907–1913
- Martinez M, Farina N, Rodriguez M, Russomando G, Parra GI. 2005. [Incidence of rotavirus in adults with diarrhea in Asuncion, Paraguay]. *Rev Argent Microbiol* 37:99-101
- Martinez N, Espul C, Cuello H, Zhong W, Jiang X, et al. 2002. Sequence diversity of human caliciviruses recovered from children with diarrhea in Mendoza, Argentina, 1995-1998. *J Med Virol* 67:289-298
- Mathers C, Fat DM, Boerma JT, World Health Organization. 2008. The global burden of disease : 2004 update. Geneva, Switzerland: World Health Organization. vii, 146 p. pp.
- Mathers CD, Fat DM, Inoue M, Rao C, Lopez AD. 2005. Counting the dead and what they died from: an assessment of the global status of cause of death data. *Bull World Health Organ* 83:171-177
- Mattison K, Shukla A, Cook A, Pollari F, Friendship R, et al. 2007. Human noroviruses in swine and cattle. *Emerg Infect Dis* 13:1184-1188

- Mattner F, Sohr D, Heim A, Gastmeier P, Vennema H, Koopmans M. 2006. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect* 12:69-74
- McCarthy M, Estes MK, Hyams KC. 2000. Norwalk-like virus infection in military forces: epidemic potential, sporadic disease, and the future direction of prevention and control efforts. *J Infect Dis* 181 Suppl 2:S387-391
- McDonnell S, Kirkland KB, Hlady WG, Aristeguieta C, Hopkins RS, et al. 1997. Failure of cooking to prevent shellfish-associated viral gastroenteritis. *Arch Intern Med* 157:111-116
- Mesquita JR, Barclay L, Nascimento MS, Vinje J. 2010. Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg Infect Dis* 16:980-982
- Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ, Thumfart JO. 2000. Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* 276:349-363
- Miagostovich MP, Ferreira FF, Guimaraes FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, et al. 2008. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl Environ Microbiol* 74:375-382
- Moreno-Espinosa S, Farkas T, Jiang X. 2004. Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. *Semin Pediatr Infect Dis* 15:237-245
- Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, et al. 2010. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol* 84:8085-8097
- Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. 2000. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 181 Suppl 2:S284-287
- Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FM, Cuevas LE, et al. 2008. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol* 153:957-960
- Nakamura K, Saga Y, Iwai M, Obara M, Horimoto E, Hasegawa S, Kurata T, Okumura H, Nagoshi M, Takizawa T. 2010. Frequent Detection of Noroviruses and Sapoviruses in Swine and High Genetic Diversity of Porcine Sapovirus in Japan during Fiscal Year 2008. *J Clin Microbiol* 48(4):1215-1222

- Napthine S, Lever RA, Powell ML, Jackson RJ, Brown TD, Brierley I. 2009. Expression of the VP2 protein of murine norovirus by a translation termination-reinitiation strategy. *PLoS One* 4:e8390
- NCBI. 2010a. Basic Local Alignment Search Tool. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (nov 2010)
- NCBI. 2010b. GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. (nov 2010)
- Ngazoa ES, Fliss I, Jean J. 2008. Quantitative study of persistence of human norovirus genome in water using TaqMan real-time RT-PCR. *J Appl Microbiol* 104:707-715
- Nilsson M, Hedlund KO, Thorhagen M, Larson G, Johansen K, et al. 2003. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol* 77:13117-13124
- Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, et al. 1997. Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *J Med Virol* 53:372-383
- Noel JS, Frankhauser RL, Ando T, Monroe SS, Glass RI. 1999. Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution. *J Infect Dis* 179:1334-1344
- Noronet. 2010a. Foodborne Viruses in Europe Net. <http://www.noronet.nl/fbve/>. (18 dez 2010)
- Noronet. 2010b. Noronet Web Site. <http://www.noronet.nl>. (18 dez 2010)
- O'Ryan ML, Mamani N, Gaggero A, Avendano LF, Prieto S, et al. 2000. Human caliciviruses are a significant pathogen of acute sporadic diarrhea in children of Santiago, Chile. *J Infect Dis* 182:1519-1522
- Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraeve WM, et al. 2008. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* 7:861-871
- Pang XL, Lee BE, Tyrrell GJ, Preiksaitis JK. 2008. Epidemiology and genotype analysis of sapovirus associated with gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2004-2007. *J Infect Dis* 199:547-551
- Parashar UD, Quiroz ES, Mounts AW, Monroe SS, Frankhauser RL, et al. 2001. "Norwalk-like viruses". Public health consequences and outbreak management. *MMWR Recomm Rep* 50:1-17

- Parashar UD, Dow L, Fankhauser RL, Humphrey CD, Miller J, et al. 1998. An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiol Infect* 121:615-621
- Parashar UD, Li JF, Cama R, DeZalia M, Monroe SS, et al. 2004. Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. *J Infect Dis* 190:1088-1092
- Parks CG, Moe CL, Rhodes D, Lima A, Barrett L, et al. 1999. Genomic diversity of "Norwalk like viruses" (NLVs): pediatric infections in a Brazilian shantytown. *J Med Virol* 58:426-434
- Parra GI, Bok K, Martinez M, Gomez JA. 2004. Evidence of rotavirus intragenic recombination between two sublineages of the same genotype. *J Gen Virol* 85:1713-1716
- Parra GI, Bok K, Martinez V, Russomando G, Gomez J. 2005. Molecular characterization and genetic variation of the VP7 gene of human rotaviruses isolated in Paraguay. *J Med Virol* 77:579-586
- Parra GI, Espinola EE, Amarilla AA, Stupka J, Martinez M, et al. 2007. Diversity of group A rotavirus strains circulating in Paraguay from 2002 to 2005: detection of an atypical G1 in South America. *J Clin Virol* 40:135-141
- Parra GI. 2009. Seasonal shifts of group A rotavirus strains as a possible mechanism of persistence in the human population. *J Med Virol* 81:568-571
- Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. 1977. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 297:86-89
- Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinje J, Parashar UD. 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 14:1224-1231
- Patel MM, Hall AJ, Vinje J, Parashar UD. 2009. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol* 44:1-8
- Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn N, Nishio O, et al. 2004. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. *J Med Virol* 73:256-261
- Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, et al. 2006a. Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIB among infants and children with diarrhea in Japan. *J Med Virol* 78:971-978



- Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Sugita K, Okitsu S, Muller WE, Ushijima H. 2006b. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan during 2004–2005. *J Med Virol* 78:839–846
- Pletneva MA, Sosnovtsev SV, Green KY. 2001. The genome of hawaii virus and its relationship with other members of the caliciviridae. *Virus Genes* 23:5-16
- Podewils LJ, Zanardi Blevins L, Hagenbuch M, Itani D, Burns A, et al. 2007. Outbreak of norovirus illness associated with a swimming pool. *Epidemiol Infect* 135:827-833
- Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286:287-290
- Reimann HA, Hodges JH, Price AH. 1945. Streptomycin for certain systemic infections and its effect on the urinary and fecal flora. *Arch Med Interna* 76:269-277
- Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, et al. 2008. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espirito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:201-206
- Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, et al. 2003. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol* 26:109-115
- Robinson S, Clarke IN, Vipond IB, Caul EO, Lambden PR. 2002. Epidemiology of human Sapporo-like caliciviruses in the South West of England: molecular characterisation of a genetically distinct isolate. *J Med Virol* 67:282–288
- Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinje J, De Bruin E, et al. 2002. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 35:246-253
- Rockx BH, Vennema H, Hoebe CJ, Duizer E, Koopmans MP. 2005. Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J Infect Dis* 191:749-754
- Rodriguez-Baez N, O'Brien R, Qiu SQ, Bass DM. 2002. Astrovirus, adenovirus, and rotavirus in hospitalized children: prevalence and association with gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35:64-68
- Rohayem J, Bergmann M, Gebhardt J, Gould E, Tucker P, et al. 2010. Antiviral strategies to control calicivirus infections. *Antiviral Research* 87:162–178
- Santos N, Soares C. *Viroses entéricas*. In: Santos N, Romanos MT, Wigg M. *Introdução à virologia humana*. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 147 – 174. 2008.

- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, et al. 2011. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17:7-15
- Schaub SA, Oshiro RK. 2000. Public health concerns about caliciviruses as waterborne contaminants. *J Infect Dis* 181 Suppl 2:S374-380
- Shieh Y, Monroe SS, Fankhauser RL, Langlois GW, Burkhardt W, 3rd, Baric RS. 2000. Detection of norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *J Infect Dis* 181 Suppl 2:S360-366
- Siebenga JJ, Vennema H, Duizer E, Koopmans MP. 2007. Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4, The Netherlands, 1994-2005. *Emerg Infect Dis* 13:144-146
- Simon A, Schildgen O, Maria Eis-Hubinger A, Hasan C, Bode U, et al. 2006. Norovirus outbreak in a pediatric oncology unit. *Scand J Gastroenterol* 41:693-699
- Smiley JR, Chang KO, Hayes J, Vinje J, Saif LJ. 2002. Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *J Virol* 76:10089-10098
- Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MC, Maranhao AG, et al. 2007. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 13:1244-1246
- Subekti D, Lesmana M, Tjaniadi P, Safari N, Frazier E, et al. 2002. Incidence of Norwalk-like viruses, rotavirus and adenovirus infection in patients with acute gastroenteritis in Jakarta, Indonesia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 33:27-33
- Svraka S, Duizer E, Vennema H, de Bruin E, van der Veer B, Dorresteyn B, Koopmans M. 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J Clin Microbiol* 45:1389-1394
- Svraka S, Vennema H, van der Veer B, Hedlund KO, Thorhagen M, Siebenga J, Duizer E, Koopmans M. 2010. Epidemiology and Genotype Analysis of Emerging Sapovirus-Associated Infections across Europe. *J Clin Microbiol* 48(6):2191-2198
- Tacket CO. 2005. Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. *Vaccine* 23:1866-1869
- Talal AH, Moe CL, Lima AA, Weigle KA, Barrett L, et al. 2000. Seroprevalence and seroincidence of Norwalk-like virus infection among Brazilian infants and children. *J Med Virol* 61:117-124
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599

- Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X. 2003. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol* 77:12562-12571
- Tan M, Hegde RS, Jiang X. 2004. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol* 78:6233-6242
- Tan M, Jiang X. 2007. Norovirus-host interaction: implications for disease control and prevention. *Expert Rev Mol Med* 9:1-22
- Tan M, Xia M, Chen Y, Bu W, Hegde RS, Meller J, Li X, Jiang X. 2009. Conservation of Carbohydrate Binding Interfaces — Evidence of Human HBGA Selection in Norovirus Evolution. *PLoS ONE* 4(4): e5058. doi:10.1371/journal.pone.0005058
- Teunis PFM, Moe CL, Liu P, E. Miller S, Lindesmith L, et al. 2008. Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology* 80:1468-1476
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680
- Thornhill TS, Wyatt RG, Kalica AR, et al. 1977. Detection by immune electron microscopy of 26- to 27- nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* 135:20-27.
- Thorven M, Grahn A, Hedlund KO, Johansson H, Wahlfrid C, et al. 2005. A homozygous nonsense mutation (428G-->A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *J Virol* 79:15351-15355
- Thouvenin E, Laurent S, Madelaine MF, Rasschaert D, Vautherot JF, Hewat EA. 1997. Bivalent binding of a neutralising antibody to a calicivirus involves the torsional flexibility of the antibody hinge. *J Mol Biol* 270:238-246
- Troeger H, Loddenkemper C, Schneider T, Schreier E, Epple HJ, et al. 2009. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut* 58:1070-1077
- Tsugawa T, Numata-Kinoshita K, Honma S, Nakata S, Tatsumi M, et al. 2006. Virological, serological, and clinical features of an outbreak of acute gastroenteritis due to recombinant genogroup II norovirus in an infant home. *J Clin Microbiol* 44:177-182

- Vainio K, Myrmel M. 2006. Molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Norway during 2000 to 2005 and comparison of four norovirus real-time reverse transcriptase PCR assays. *J Clin Microbiol* 44:3695-3702
- van Der Poel WH, Vinje J, van Der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MP. 2000. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis* 6:36-41
- Verhoef L, Depoortere E, Boxman I, Duizer E, van Duynhoven Y, et al. 2008. Emergence of new norovirus variants on spring cruise ships and prediction of winter epidemics. *Emerg Infect Dis* 14:238-243
- Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich M. 2007. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J* 26:602-606
- Victoria M, Miagostovich MP, Ferreira MS, Vieira CB, Fioretti JM, et al. 2009. Bayesian coalescent inference reveals high evolutionary rates and expansion of Norovirus populations. *Infect Genet Evol* 9:927-932
- Victoria M, Rigotto C, Moresco V, de Abreu Correa A, Kolesnikovas C, et al. 2010a. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianopolis City, Southern Brazil. *J Appl Microbiol* 109:231-238
- Victoria M, Guimaraes FR, Fumian TM, Ferreira FF, Vieira CB, et al. 2010b. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health* 8:158-165
- Vidal R, Solari V, Mamani N, Jiang X, Vollaire J, et al. 2005. Caliciviruses and foodborne gastroenteritis, Chile. *Emerg Infect Dis* 11:1134-1137
- Vidal R, Roessler P, Solari V, Vollaire J, Jiang X, et al. 2006. Novel recombinant norovirus causing outbreaks of gastroenteritis in Santiago, Chile. *J Clin Microbiol* 44:2271-2275
- Vinje J, Koopmans MP. 2000. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol* 38:2595-2601
- Vinje J, Deijl H, van der Heide R, Lewis D, Hedlund KO, Svensson L, Koopmans MP. 2000. Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses. *J Clin Microbiol* 38:530-536.
- Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. 2004. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods* 116:109-117

- Westrell T, Dusch V, Ethelberg S, Harris J, Hjertqvist M, Jourdan-da Silva N, Koller A, Lenglet A, Lisby M, Vold L. 2010. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Euro Surveill.* 2010;15(12):pii=19524.
- Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Bresee JS, Beard RS, et al. 2004. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus--United States, 2002. *J Infect Dis* 190:27-36
- Widdowson MA, Glass R, Monroe S, Beard RS, Bateman JW, et al. 2005. Probable transmission of norovirus on an airplane. *JAMA* 293:1859-1860
- Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 9:247-262
- World Health Organization. 2005. The World health report : 2005 : make every mother and child count. Geneva: World Health Organization. 229 p. pp.
- Wu FT, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo CH, Liang SY, Hung CH, Dah-Shyong Jiang D, Hsin Chang J, Yang JY, Wu HS, Yang CF. 2008. Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerg Infect Dis* 14:1169–1171
- Xerry J, Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Gray JJ. 2010. Genetic characterization of genogroup I norovirus in outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 48:2560-2562
- Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250:1580-1583
- Zahorsky J. 1929. Hyperemesis hemis or winter vomiting disease. *Arch Pediatr* 46:391-395
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346:312-323
- Zheng DP, Widdowson MA, Glass RI, Vinje J. 2010. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J Clin Microbiol* 48:168-177
- Zintz C, Bok K, Parada E, Barnes-Eley M, Berke T, et al. 2005. Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. *Infect Genet Evol* 5:281-290