

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

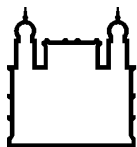
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

JULIANA DA SILVA RIBEIRO DE ANDRADE

**NOROVÍRUS ASSOCIADOS A SURTOS DE GASTROENTERITE AGUDA NO
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

RIO DE JANEIRO

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

JULIANA DA SILVA RIBEIRO DE ANDRADE

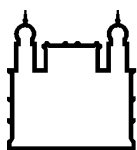
NOROVÍRUS ASSOCIADOS A SURTOS DE GASTROENTERITE AGUDA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Marize Pereira Miagostovich

RIO DE JANEIRO

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

JULIANA DA SILVA RIBEIRO DE ANDRADE

NOROVÍRUS ASSOCIADOS A SURTOS DE GASTROENTERITE AGUDA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

ORIENTADORA: Prof. Dra. Marize Pereira Miagostovich

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Marize Pereira Miagostovich

Aprovada em: 26/02/2013

EXAMINADORES:

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza - Presidente

Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Xavier Castro

Prof^ª. Dr^ª. Yvone Benchimol Gabbay

Prof^ª. Dr^ª. Debora Regina dos Santos Lopes

Prof. Dr. Fernando do Couto Motta

Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2013

Este trabalho foi realizado no Laboratório de
Virologia Comparada e Ambiental do Instituto
Oswaldo Cruz / Fiocruz sob orientação da Dra.
Marize Pereira Miagostovich.

**“Nunca se afaste dos seus sonhos, pois se eles se forem,
você continuará vivendo, mas terá deixado de existir.”**

Charles Chaplin

**Dedico esse trabalho a Mauro e Angela, pelo
amor incondicional e por fazerem parte
de cada conquista da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), a Coordenação Geral de Laboratórios (CGLAB), Instituto Oswaldo Cruz/ Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Ao Laboratório Central do Rio Grande do Sul (LACEN-RS), em particular a Jeanice Cardoso pelo trabalho de obtenção e envio de amostras fecais utilizadas nesse estudo.

À minha orientadora Dr^a Maize Pereira Miagostovich, pessoa que tenho muito carinho e respeito, por aceitar me orientar, pela dedicação, paciência, apoio e por acreditar que eu seria capaz de realizar esse projeto. Por me ensinar tanto, por me incentivar e por fazer parte do meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Dr. José Paulo G. Leite por permitir a realização desse trabalho, pelos momentos de descontração e risadas e por sempre acreditar que eu poderia alcançar meus objetivos. Por ter me aceitado como membro da equipe do laboratório, eu não estaria aqui sem seu apoio.

À Dr^a. Marcia Terezinha Baroni pelo excelente trabalho de revisão e por aceitar fazer parte da banca examinadora desta dissertação.

Às Dr^{as}. Yvone Gabbay e Tatiana Xavier por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

Ao Dr. Felipe Aníbal Carvalho-Costa por colaborar com as análises estatísticas dos resultados, e por estar sempre disponível mesmo com tantos afazeres.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA):

A Mônica Simões Rocha Ferreira por colaborar muito com esse trabalho, disponibilizando artigos, conhecimento e resultados. Pela amizade, pelas palavras de carinho e de consolo.

A Julia Fioretti pelas informações e conhecimentos valiosos, pelas conversas científicas e não científicas. Sempre dedicada e disposta a ajudar e sempre tão doce, uma pessoa brilhante.

A Maria da Penha Xavier, pelas palavras de carinho, pelas conversas longas e risadas, pela amizade. Por sempre estar por perto e disponível a ajudar nas tarefas do laboratório e do mestrado. Sempre otimista e com alto astral, foi ótima companhia durante esse processo.

A Silvana Augusta Rodrigues Portes, pela amizade de tanto tempo, por ter me ensinado muito, por fazer parte de bons e maus momentos, por fazer parte da minha vida.

A Francisca dos Santos por ser minha segunda mãe, por cuidar de mim e de todos do laboratório com tanto carinho e por trazer conforto para meu coração sempre que preciso.

A Alexandre Fialho e Eduardo Volotão pelo suporte laboratorial, banco de dados, conhecimentos e informações, por estarem envolvidos de alguma forma com este trabalho.

Rosane Assis pelo suporte laboratorial, conversas e por me ajudar quando precisei e momentos de descontração.

Aos que fazem ou fizeram parte do LVCA e aos colegas de outros laboratórios, que tem participação direta ou indireta nesse trabalho: Adriana Corrêa, Ana Carolina Ganime, Ana Calorine Sá, Ana Pinto, Carmen Baur, Fabiana Melgaço, Fernanda Diniz, Flavia Guimarães, Fernando Lopez, Gentil Arthur, Hugo Resque, Juliana Bragazzi, Luciane Almeida, Ludmila Rocha, Marcelle Figueira, Maria Eugênia, Mariela Martinez, Marilda Almeida, Marilene Ribeiro, Matias Victoria, Matias Castels, Raquel Cunha, Tatiana Prado, Tatiana Rose, Thatiane Carneiro, Tulio Fumian e Yasmin Farias, obrigada pelos momentos de descontração, pelas risadas, pelo ombro amigo, pelas conversas, troca de conhecimentos, vocês foram muito importantes.

Yasmine Rangel pela amizade verdadeira, pelas conversas, risadas, apoio e por estar sempre presente.

Debora Lopes por alegrar meus dias.

A todos os meus amigos, mesmo aqueles que não vejo há tanto tempo, obrigada pelas risadas, por me apoiarem, por simplesmente me escutarem, por serem companheiros para todas as horas, pessoas que moram no meu coração.

À minha família, meus avós, tias e tios, primos, afilhado, padrinho, obrigada pelo apoio sempre, por me ensinarem valores e por me darem amor.

Ao meu namorado, companheiro e amigo Leonardo Azevedo por estar do meu lado sempre, nos momentos bons e ruins, por ter me apoiado tanto, por ter compreendido minhas ausências e meus dias de mau humor. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus pais Angela e Mauro e meu irmão Oscar pelo amor incondicional, pelo carinho, educação, pela pessoa que sou. Só cheguei até aqui e conquistei tudo o que tenho porque sempre acreditaram e me apoiaram. Obrigada por existirem.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3CLpro – 3C-like Protease
A – adenina
aa – aminoácido
ABO – grupo A-B-O de histocompatibilidade
AdV- adenovirus
AstV - astrovirus
BLAST – do inglês *Basic Local Aligment Search Tool*
CA – Califórnia
Ca+2 – cátion cálcio
CDC – do inglês *Center for Disease Control and Prevention*
cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar
cm³ – centímetros cúbicos
CV - calicivirus
dATP – Desoxiadenosina trifosfato
dCTP – Desoxicitidina trifosfato
dGTP – desoxiguanosina trifosfato
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucléico
DNase- desoxirribonuclease
dNTP – Desoxirribonucleotídio trifosfato
Domínio P – do inglês domínio *Protruding*
Domínio S – do inglês domínio *Shell*
dTTP – Deoxitimidina trifosfato
EDTA – ácido etilenodiamino tetracético
EIE – ensaios imunoenzimáticos
EPA – do inglês *Environmental Protection Agency*
EPI- Equipamento de proteção individual
EUA – Estados Unidos da América
FEE – Fundação de Economia e Estatística
Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz
FUT – fucosil transferase
g – gramas
g – gravidade
G – guanina
GA – gastroenterites agudas
H - bases A/T/C
H₂O – água
HBGA – do inglês *Histo-Blood Group Antigens* (antígenos de histocompatibilidade)
HCl – ácido clorídrico
I – inosina
IAHA – do ingles *imuno adherence hemagglutination*
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV – do inglês *International Committee for Taxonomy of Viruses*
IELs – do inglês *Intercellular Epithelial Cells*
IgA – imunoglobulina A
IgG – imunoglobulina G
IgM – imunoglobulina M

IME – imunomicroscopia eletrônica
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
IUPAC – do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*
K – bases G/T
kb – kilobases
kDa – kilodaltons
Km² – quilômetros quadrados
L – litro
LACEN – Laboratório Central de Saúde
LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental
M – Molar
ME – microscopia eletrônica
mg – miligramas
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
min – minuto
mL – mililitros
mM – milimolar
n – número
NaOH – hidróxido de sódio
NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*
NLV – do inglês *Norwalk-like viruses*
nm – nanômetro
NoV – norovirus
N-terminal – extremidade amino terminal
NTPase – nucleosídeo trifosfato hidrolase
°C – graus Celsius
ORF – do inglês *Open Reading Frame* (fase aberta de leitura)
p – valor de P
p20 – proteína de 20KDa
p22 – proteína de 22 kDa
p40 - proteína de 40KDa
p48 – proteína de 48 kDa
pb – pares de bases
PCR – reação em cadeia pela polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
pmol – picomoles
poli A ou (A)_n – cauda poliadenilada
p.p.m. – partes por milhão
qRT-PCR – reação em cadeia pela polimerase quantitativa precedida pela transcrição reversa
q.s.p. – quantidade suficiente para
R – purina (A/G)
RdRp – RNA polimerase RNA dependente
RIE – radiominunoensaio
RNA – ácido ribonucleico
RNase- Ribonuclease
RS – Rio Grande do Sul
RT – transcriptase reversa
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa
RV-A – rotavírus grupo A

S – bases C/G

subdomínio P1 – do inglês subdomínio *Protruding 1*

subdomínio P2 – do inglês subdomínio *Protruding2*

SRSV – do inglês *small, round-structured virus*

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	IX
LISTA DE QUADROS	XV
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE FIGURAS	XVI
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 GASTROENTERITES.....	1
1.2 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO.....	2
1.3 GENOMA E MORFOLOGIA VIRAL	6
1.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	10
1.5 CICLO REPLICATIVO	12
1.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, PATOGÊNESE E TRATAMENTO.....	14
1.7 PREVENÇÃO E CONTROLE	16
1.7.1 Imunidade e vacina.....	17
1.8 EPIDEMIOLOGIA	21
1.8.1 Distribuição geográfica.....	24
1.8.1.1 Norovirus no Brasil.....	26
1.8.2 Variantes de norovirus GII.4.....	27
1.8.3 Vigilância.....	28
1.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	30

2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	37
4.2 ÁREA DE ESTUDO	37
4.3 ESPÉCIMES CLÍNICOS E FLUXOGRAMA PARA ESTUDOS DE EPIDEMIOLOGIA DOS NOV	38
4.4 ESPÉCIMES CLÍNICOS PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	39
4.5 SUSPENSÃO FECAL	42
4.6 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL	42
4.7 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA PARA OBTENÇÃO DE DNA COMPLEMENTAR (CDNA)	42
4.8 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS NOROVIRUS PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PRECEDIDA POR TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)	43
4.8.1 Iniciadores para reação em cadeia da polimerase (PCR)	43
4.8.2 Detecção dos norovírus pela Reação em Cadeia da Polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) para amplificação da região parcial da ORF1-Região B	45
4.8.3 Caracterização molecular dos norovírus pela Reação em Cadeia da Polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) para amplificação da região parcial da ORF2- Região D	46
4.8.4 Caracterização molecular dos norovírus pela Reação em Cadeia da Polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) para amplificação da região parcial da ORF2- Região C	47
4.8.5 Caracterização molecular de variantes de norovirus genótipo GII.4 pela Reação em Cadeia da Polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) para amplificação da região parcial da ORF2- Subdomínio P2	48

4.8.6 <i>Análise dos produtos de PCR em gel de agarose</i>	49
4.8.7 <i>Purificação e quantificação dos amplicons obtidos</i>	49
4.8.8 <i>Sequenciamento nucleotídico do genoma viral</i>	50
4.8.9 <i>Análise das sequências nucleotídicas</i>	52
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5. RESULTADOS	56
5.1 RESULTADOS LABORATORIAIS, ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS.....	56
5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS NOROVIRUS.....	62
5.2.1 <i>Variantes de norovirus GI.4</i>	67
6. DISCUSSÃO	72
6.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	74
6.1.1 <i>Variantes de norovirus GI.4</i>	78
7. CONCLUSÕES	80
8. PERSPECTIVAS	82
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
10. ANEXOS	110
10.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	111
10.2 FICHA EPIDEMIOLÓGICA	112

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1: Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa (RT) para a obtenção de cDNA a partir do RNA viral extraído, utilizando o protocolo da SuperScript®III.	43
Quadro 4.2: Iniciadores utilizados na reação em cadeia da polimerase para amplificação do genoma de norovírus humano.	44
Quadro 4.3: Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação parcial da ORF1 (Região B).	45
Quadro 4.4: Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação parcial da ORF2 (Região D).	46
Quadro 4.5: Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação parcial da ORF2 (Região C).	47
Quadro 4.6: Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação parcial da ORF2 (Subdomínio P2).	48
Quadro 4.7: Reagentes utilizados na reação de sequenciamento nucleotídico do genoma dos norovírus.	52
Quadro 4.8: Protótipos de norovirus humanos obtidos do <i>GenBank</i> utilizados neste estudo com propósito comparativo.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1: Distribuição temporal e geográfica da frequência das infecções e dos surtos causados por norovirus (NoV) no período de 2004 a 2011 nas diferentes mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul	57
Tabela 5.2: Distribuição cumulativa (2004 a 2011) dos casos positivos de norovírus de acordo com as estações do ano.	59
Tabela 5.3: Frequência de detecção de norovirus de acordo com o grupo etário.	60
Tabela 5.4: Sinais e sintomas clínicos em pacientes infectados e não infectados por norovírus (NoV), de acordo com o grupo etário no período de 2004 a 2006.	61
Tabela 5.5: Distribuição temporal e geográfica dos genótipos de norovírus no período de 2004 a 2011 nas diferentes mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul.	66
Tabela 5.6: Distribuição temporal e geográfica das variantes de norovírus GII.4 no período de 2004 a 2011 nas diferentes mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul.	70
Tabela 5.7: Distribuição temporal-geográfica e caracterização molecular dos surtos associados a norovirus no estado do Rio Grande do Sul no período de 2004 a 2011.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Agregado de partículas do agente Norwalk-like virus encontrado em filtrados de fezes por imunomicroscopia eletrônica.....	3
Figura 1.2: Classificação dos norovirus em cinco genogrupos (GI-GV) e 35 genótipos, com base na análise filogenética da sequência completa da proteína de capsídeo VP1.....	5
Figura 1.3: Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína de capsídeo VP1, mostrando as principais variantes de norovirus GII.4 e os anos em que circularam.....	6
Figura 1.4: Representação esquemática da organização genômica dos norovirus.....	8
Figura 1.5: Estrutura do capsídeo de uma partícula de Norwalk-like vírus.....	10
Figura 4.1: Mapa das 35 microrregiões e sete mesorregiões do Estado do Rio Grande do Sul.....	38
Figura 4.2: Fluxograma de metodologias utilizadas na detecção de norovirus (NoV).....	39
Figura 4.3: Fluxograma de procedimentos para genotipagem de norovirus (NoV) e caracterização molecular das variantes de NoV GII.4.....	41
Figura 5.1: Distribuição mensal por ano de casos positivos para norovirus ocorridos no estado do Rio Grande do Sul no período de 2004-2011.....	58
Figura 5.2: Árvore filogenética baseada na análise da região parcial (D) do gene que codifica para a proteína VP1 de duas amostras de norovirus pertencentes ao genogrupo I (GI).....	62
Figura 5.3: Árvore filogenética baseada na análise da região parcial (D) do gene que codifica para a proteína VP1 de 57 amostras de norovirus pertencentes ao genogrupo II (GII).....	63
Figura 5.4: Árvore filogenética baseada na análise da região parcial (C) do gene que codifica para a proteína VP1 de 5 amostras de norovirus pertencentes ao genogrupo II (GII).....	64
Figura 5.5: Percentual de genótipos de norovirus detectados em amostras provenientes das diferentes mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul, no período de 2004 a 2011.....	65
Figura 5.6: Árvore filogenética baseada na análise da região parcial (P2) do gene que codifica para a proteína VP1 de 46 amostras de norovirus pertencentes ao genogrupo II genótipo 4 (GII.4).....	68

RESUMO

Os vírus do gênero *Norovirus* pertencem à família *Caliciviridae* e são divididos em cinco genótipos (G) e 35 genótipos, sendo GI, GII e GIV capazes de infectar humanos e o genótipo GII.4 com suas variantes o de maior impacto epidemiológico. Os norovirus (NoV) são os principais agentes de surtos de gastroenterite aguda (GA) em todo o mundo, infectando indivíduos de todos os grupos etários. No Brasil, a importância destes vírus em casos esporádicos e de surtos de GA tem sido demonstrada pela prevalência e diversidade dos vírus circulantes em alguns estados, embora ainda não exista um sistema de vigilância rotineiro que investigue a prevalência desses vírus em todo o país. A ausência de dados sobre a caracterização molecular dos NoV no estado do Rio Grande do Sul (RS) chama atenção pelo número de surtos de GA relatados nos últimos anos. O objetivo desta dissertação foi realizar um estudo de epidemiologia e caracterização molecular de NoV provenientes de casos de GA decorrentes de surtos ocorridos no RS no período de 2004 a 2011, contribuindo para o estabelecimento da vigilância epidemiológica e molecular desses vírus. Com esta finalidade, foram analisadas 2265 amostras de fezes enviadas pelo Laboratório Central do Rio Grande do Sul (LACEN-RS) do estado ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) provenientes de 741 surtos ocorridos neste período. Para detecção simultânea dos NoV GI e GII foi realizada a reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), tendo como alvo de amplificação a região da RNA polimerase viral RNA dependente (RdRp), conhecida como região B. NoV foi detectado em 36,1% (817/2265) das amostras estudadas, sendo associado a 327 (44,1%) surtos, dos quais 60,5% (109/180) ocorridos no ano de 2006. A análise dos aspectos epidemiológicos revelou uma tendência no aumento da taxa de infecção de acordo com o aumento do grupo etário, assim como uma sazonalidade dos vírus nos meses de primavera e inverno, com taxas de detecção de 41,9% e 43%, respectivamente. Em relação aos aspectos clínicos, vômito e dor abdominal foram as manifestações mais observadas nos indivíduos infectados. Para a caracterização molecular dos vírus, de cada um dos oito anos de estudo, foram selecionados aleatoriamente 142 vírus representativos das sete mesorregiões que compõem o estado. A caracterização em GI e GII foi realizada pelo sequenciamento parcial dos nucleotídeos pela amplificação genômica de duas regiões que codificam a proteína do capsídeo viral (VP1), denominadas região C e D. Deste total, 110 vírus foram caracterizados como GII (77,4%) e duas como GI (1,4%), sendo o GII.4 (72,3%) o genótipo mais detectado, seguido pelo GII.6 (9,8%). Em menor número também foram caracterizados GII.2, GII.3, GII.4, GII.6, GII.12, GII.13, GII.14, GII.15, GII.17, GII.21, GI.1 e GI.3. Com o subsequente sequenciamento da região P2, também localizada na VP1, foram identificadas cinco variantes do GII.4 circulando no estado, nomeadas: 2003, 2004, 2006a, 2006b e 2010. A variante 2006b foi detectada em 47,8% (22/46) das amostras, seguida da variante 2010 com 41,3% (19/46) de detecção entre os GII.4. A grande diversidade de genótipos encontrados e alta prevalência do genótipo GII.4 e suas variantes corrobora a necessidade de se manter uma vigilância epidemiológica e molecular desses vírus no país, principalmente devido a associação do surgimento de novas variantes a surtos de de NoV de dimensões globalizadas.

Palavras-chave: norovírus; gastroenterite; genótipos; epidemiologia molecular.

ABSTRACT

Viruses of the genus *Norovirus* belongs to the family *Caliciviridae* and are divided into five genogroups (G) and 35 genotypes, GI, GII and GIV able to infect humans and the genotype GII.4 and its variants has the highest epidemiological impact. The norovirus (NoV) are the main agents of outbreaks of acute gastroenteritis (AG) worldwide, infecting individuals of all age groups. In Brazil, the importance of these viruses in sporadic cases and outbreaks of AG has been demonstrated by the prevalence and diversity of circulating viruses in some states, although there is no system of routine surveillance to investigate the prevalence of these viruses across the country. The absence of data on the molecular characterization of NoV in the state of Rio Grande do Sul (RS) stands out by the number of outbreaks of AG reported in recent years. The aim of this dissertation was perform a study of the epidemiology and molecular characterization of NoV from cases of AG due to outbreaks in the RS state from 2004 to 2011, contributing to the establishment of epidemiological and molecular surveillance of these viruses. For this purpose, we analyzed 2265 stool samples sent by the Central Laboratory of RS (LACEN-RS) of the state to Virology Laboratory Comparative and Environmental (LVCA) from 741 outbreaks in this period. For simultaneous detection of GI and GII NoV was performed polymerase chain reaction reverse transcription (RT-PCR), aiming the target amplification the region of viral RNA dependent RNA polymerase (RdRp), known as Region B. NoV was detected in 36,1% (817/2265) of the samples studied, and linked to 327 (44,1%) outbreaks, of which 60,5% (109/180) occurred in 2006. The analysis of epidemiological revealed a tendency in the increased rate of infection in accordance with increasing in the age, as well as seasonality of virus in the months of spring and winter, with detection rates of 41,9% and 43%, respectively. Regarding clinical aspects, vomiting and abdominal pain were the most observed manifestations in infected individuals. For the molecular characterization of the viruses, each of the eight years of the study, were randomly selected 142 representative viruses of the seven mesoregions belonging to state. The characterization in GI and GII was performed by partial sequencing of genomic amplification of nucleotides by two regions that encodes viral capsid protein (VP1), termed region C and D. Of this total, 110 viruses were characterized as GII (77,4%) and two as GI (1,4%), being the GII.4 (72,3%) genotype mostly detected, followed by GII.6 (9,8%). In lower number were also characterized GII.2, GII.3, GII.4, GII.6, GII.12, GII.13, GII.14, GII.15, GII.17, GII.21, and GI.1 GI.3. With the subsequent sequencing of the P2 region, also located in VP1, we identified five variants of GII.4 circulating in the state, namely: 2003, 2004, 2006a, 2006b and 2010. The variant 2006b was detected in 47,8% (22/46) samples, then the variant 2010 with 41,3% (19/46) between the GII.4 detection. The great diversity of genotypes found and high prevalence of genotype GII.4 and its variants supports the need to maintain a molecular and epidemiological surveillance of these viruses in the country, mainly due to the association of the emergence of new variants of NoV with outbreaks of globalized dimensions.

Keywords: Norovirus; gastroenteritis; genotypes; molecular epidemiology.

1-Introdução

1.1-Gastroenterites

O termo gastroenterite inclui uma variedade de estados patológicos cuja principal manifestação é a diarreia, que pode vir acompanhada de náusea, vômito e dores abdominais (CDC, 2011). Diarreia é a segunda maior causa de mortes em crianças menores de cinco anos de idade, com cerca de 1,5 milhão de óbitos por ano em todo o mundo (WHO, 2011). A perda de águas e eletrólitos pode levar à desidratação grave e morte, principalmente em crianças mal nutridas e imunocomprometidas (WHO, 2011).

Em todo o mundo, bilhões de indivíduos não possuem acesso a água tratada e/ou saneamento básico, fatores que aumentam o risco de transmissão de doenças diarreicas (Prüss-Üstün et al., 2008; WHO, 2011). Entretanto, a diarreia acomete indivíduos de todas as classes sociais, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, apesar de haver uma correlação entre a gravidade da doença e pobreza (Keusch et al., 2006).

Os patógenos que podem causar doenças diarreicas incluem vírus, bactérias, protozoários e helmintos. Os principais vírus envolvidos com doenças diarreicas são o rotavirus-A (RV-A) e o norovirus (NoV), sendo o NoV considerado o agente mais comum em casos de surtos de gastroenterite aguda (GA) viral em adultos e o segundo mais comum em casos de diarreia grave em crianças menores de cinco anos de idade (WHO, 2011).

1.2-Histórico e classificação

A partir da década de 1940, pesquisadores sugeriram que os quadros de gastroenterites não poderiam ser atribuídos exclusivamente a bactérias e protozoários (Badger et al., 1956; Dingle et al., 1956). Para confirmar essa hipótese, estudos clínicos foram conduzidos com voluntários que foram expostos a filtrados de vômito e fezes de indivíduos doentes (Gordon et al., 1947). Entretanto, mesmo depois de 20 anos ainda continuava desconhecido o patógeno que causava a doença.

No ano de 1968, 50% dos alunos e professores de uma escola elementar na cidade de Norwalk, Ohio foi acometido por uma doença caracterizada principalmente por vômito, náusea, dores abdominais e diarreia, sintomas semelhante a denominada “*winter vomiting disease*”, descrita em 1929 (Zahorsky, 1929). Nenhuma bactéria foi detectada, tornando suspeito um agente viral como causador da doença. Tentativas de recuperar o patógeno por meio de propagação em cultivo celular não foram bem sucedidas (Adler & Zickl, 1969). Estudos de caracterização do patógeno utilizaram filtrados em voluntários e revelaram que o agente “Norwalk” era uma partícula pequena (menor que 36nm) e resistente a éter, ácido e altas temperaturas. Mais uma vez, a tentativa de propagação do patógeno em cultivo de células e inóculo em animais não foi bem sucedida (Dolin et al., 1971, 1972).

Kapikian e colaboradores (1972), com o uso de imuno microscopia eletrônica (IME), visualizaram partículas de 27nm de diâmetro (Figura 1.1), provenientes de fezes de voluntários que foram expostos a filtrados de fezes derivadas de pacientes do surto de Norwalk. Complexos antígeno-anticorpo foram formados pela precipitação das partículas virais após utilização de soro de um paciente que desenvolveu a doença após

exposição com filtrado. Esses complexos foram visualizados por microscopia eletrônica e denominados *Norwalk-like viruses*.

A morfologia característica dos calicivirus, denominados *Small Round Structured Viruses* (SRSV), foi observada por Madeley e Cosgrove no ano de 1976 (Madeley & Cosgrove, 1976). Vários surtos que ocorreram nos anos seguintes foram associados aos SRSV, confirmando ser um patógeno causador de doença intestinal humana (Chiba et al., 1979; Cubitti et al., 1979). Entretanto, somente em 1981, Greenberg e colaboradores publicaram um estudo que demonstrava a presença de uma proteína estrutural de 59 kDa no agente Norwalk e sugeriram que esse agente pertencia a família *Caliciviridae* (Greenberg et al., 1981).

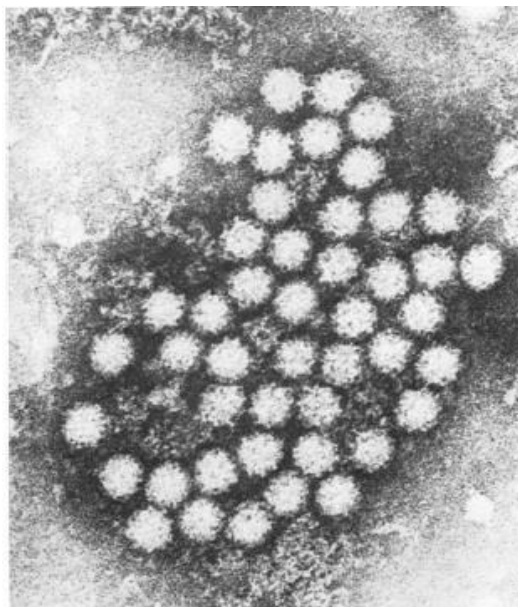


Figura 1.1: Agregado de partículas do agente *Norwalk-like virus* encontrado em filtrados de fezes por imunomicroscopia eletrônica. Adaptado de Kapikian e colaboradores (1972).

A família *Caliciviridae* havia sido criada anteriormente pelo III Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Matthews et al., 1979). Seu nome foi

derivado da palavra em latim *calix*, em virtude da estrutura de cálice formada por depressões visualizadas na superfície do capsídeo de simetria icosaédrica desses vírus. Uma característica comum aos calicivirus inclui a proteína VPg (*Viral Protein genome-linked*), envolvida na replicação do genoma, ligada covalentemente ao RNA viral na extremidade 5', onde em outros vírus fica um *cap* metilado (Black et al., 1978; Burroughs & Brown, 1978).

Com o advento das técnicas moleculares, Jiang e colaboradores forneceram evidências de que os Norwalk-like vírus eram calicivirus por meio da clonagem e sequenciamento completo de seu genoma, demonstrando que este consistia de um RNA fita simples poliadenilado (Jiang et al., 1990). Outros estudos corroboraram a inclusão desses vírus na família *Caliciviridae* com elucidações a respeito do genoma completo dos Norwalk e também de outros calicivirus, como os SRSV (Jiang et al., 1993; Ando et al., 1994; Hardy & Estes, 1996; Atmar et al., 2001).

Em 1998, o ICTV determinou que os gêneros da família *Caliciviridae* seriam definidos por clados geneticamente distintos com embasamento em análise filogenética. Atualmente, a família possui cinco gêneros: *Vesivirus*, *Lagovirus*; *Norovirus* com protótipo *Norwalk virus*; *Nebovirus* e *Sapovirus* (Clarke et al., 2011).

Utilizando o método de distância sem correção, baseado na sequência aminoacídica completa do capsídeo viral (ORF2), Zheng e colaboradores (2006) propuseram um sistema de classificação filogenético para o gênero *Norovirus* (NoV) classificando-os em genogrupos (G) e genótipos (GG). Para pertencerem ao mesmo G, a sequência aminoacídica completa da ORF2 deve apresentar distância entre 45-61,4%; vírus com distância entre 14,3-43,8% são agrupados em diferentes GG e de 0-14,1% agrupados em diferentes estirpes. Com esta classificação os NoV foram divididos em cinco G: GI-V, sendo os GI, II e IV responsáveis por infecções em humanos. Ao todo,

foram descritos 35 genótipos, sendo oito GI, 21 GII, três GIII, dois GIV e um GV (Figura 1.2).

Recentemente, Zheng e colaboradores (2010), analisando filogeneticamente sequencias completas da ORF2 de NoV GII.4, definiram como variantes deste genótipos vírus que apresentam mais de 5% de variação na sequencia aminoacídica da VP1. As variantes são nomeadas de acordo com o ano e/ou local onde foram isoladas, sendo as principais: US95/96; variante 2002 ou *Farmington Hills*; 2004 ou *Hunter*; 2006a ou *Laurens*; 2006b ou *Minerva* e 2010 ou *New Orleans* (Figura 1.3).

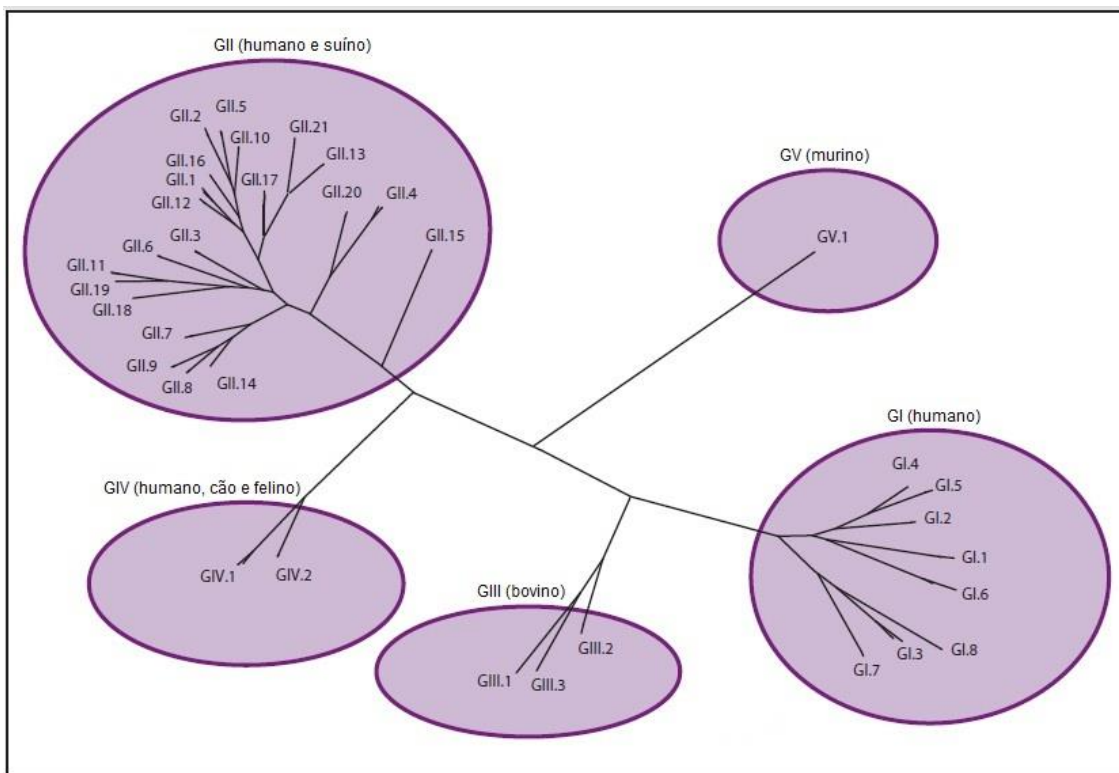


Figura 1.2: Classificação dos norovírus em cinco genogrupos (GI-GV) e 35 genótipos, com base na análise filogenética da sequencia completa da proteína de capsídeo VP1. Adaptado de CDC (2011).

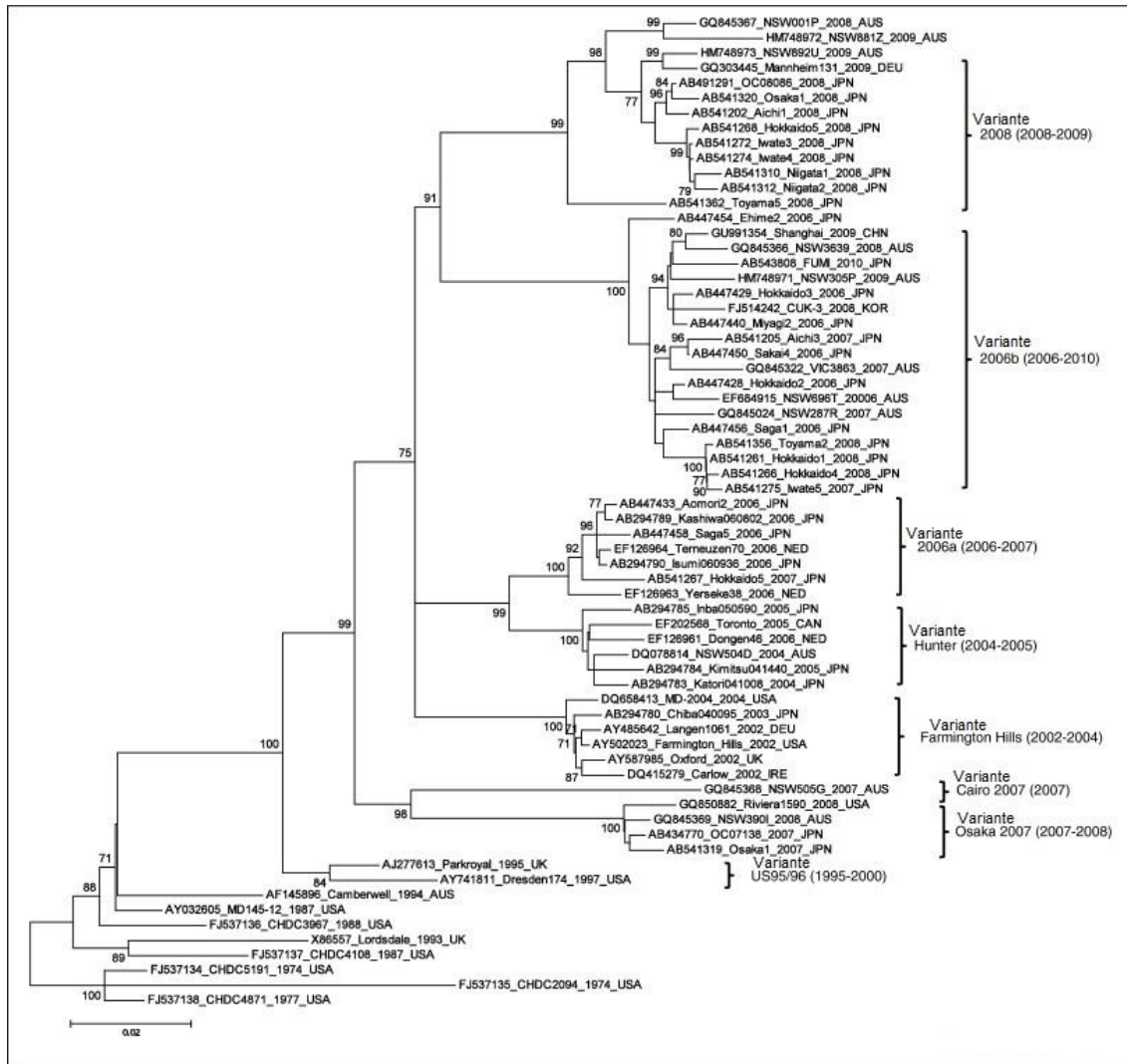


Figura 1.3: Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína de capsídeo VP1, mostrando as principais variantes de norovirus GII.4 e os anos em que circularam. Adaptado de Bull e colaboradores (2011).

1.3- Genoma e morfologia viral

O genoma dos NoV é constituído por um RNA de fita simples, polaridade positiva de aproximadamente 7,7 Kb. Está organizado em três fases abertas de leitura (ORFs 1, 2 e 3), uma região não traduzida (UTR) em cada uma das extremidades 3' e 5'

e uma cauda poli (A) na extremidade 3' do genoma viral. Estes vírus possuem ainda um RNA subgenômico de aproximadamente 2,3 Kb contendo as ORFs 2 e 3 e uma UTR em sua extremidade 3' (Figura 1.4). A ORF 1 possui aproximadamente 5Kb, representando cerca de 65% do genoma viral e codifica uma poliproteína não estrutural de 193 a 200 kDa, que é clivada proteoliticamente nas seguintes proteínas: a) p48, que regula o transporte de vesículas e inibe a expressão de proteínas de superfície da célula hospedeira e ainda fornece suporte para a maquinaria de replicação; b) p40 que tem função de nucleosídeo trifosfatase (NTPase); c) p22 (ou p20, depende do genogrupo) que inibe a secreção de proteínas da célula hospedeira; d) VPg que é uma proteína que pode atuar como um iniciador da replicação viral, após sua uridilização, e atua ainda no recrutamento de fatores de tradução e também o RNA viral à maquinaria de tradução da célula; e) 3CL^{pro} que está envolvida na clivagem da poliproteína codificada pela ORF1 e finalmente a RNA polimerase RNA dependente (RpRd) que replica o genoma viral e gera Vpg uridilada. As ORF2 e ORF3 codificam as proteínas estruturais do capsídeo viral VP1 (58-60 kDa) e VP2 (208-268 kDa). Na extremidade 5' do RNA genômico e subgenômico se encontra ligada covalentemente a proteína VPg, de aproximadamente 15 kDa, que pode estar associada a síntese de novas moléculas de RNA viral (Nilsson et al., 2003; Hardy, 2005; Karst, 2010; Jiang et al., 1993).

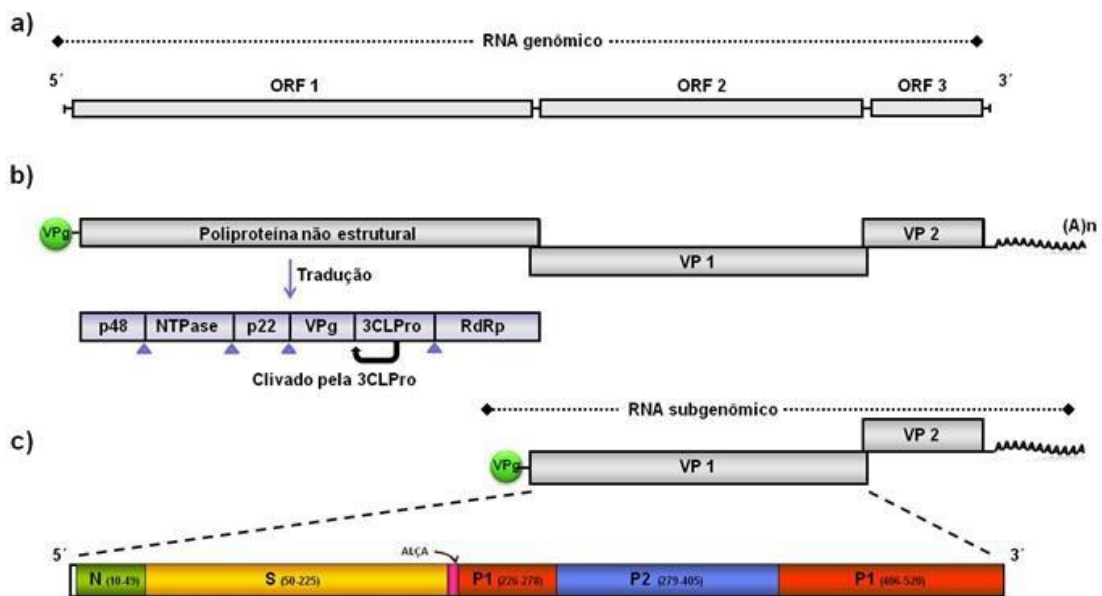


Figura 1.4: Representação esquemática da organização genômica dos norovirus. A a) Representação das ORF1, ORF2 e ORF3. b) ORF 1-poliproteína não estrutural composta pelos domínios p48: proteína amino-terminal; NTP: proteína nucleosídeo trifosfatase (NTPase); p22: proteína p22; VPg: proteína viral de ligação ao genoma; 3C: protease 3C-like(3CL^{Pro}); RdRp: RNA polimerase RNA dependente; ORF2 - VP1: proteína principal do capsídeo; S, P1, P2: subdomínios da proteína VP1; ORF3- VP2: proteína menor do capsídeo; AAA_n: Cauda Poli(A); RNA subgenômico contendo os genes que codificam as proteínas virais do capsídeo. c) A VP1 é constituída por: N: região amino terminal, S, P1, P2: subdomínios da proteína VP1. Adaptado de Meyers (2000), Donaldson (2008).

A partícula viral é não-envelopada, esférica e possui simetria icosaédrica, medindo de 26 a 37 nm de diâmetro. O capsídeo é formado por dímeros da proteína VP1 organizados em 90 capsômeros que formam 32 depressões em sua superfície. A proteína de capsídeo VP1 é a maior proteína do capsídeo viral, com aproximadamente 530 aminoácidos (aa). Dois domínios conservados flanqueiam um domínio central variável que possui propriedades antigênicas que podem definir a especificidade de diferentes estirpes. A VP1 possui dois domínios denominados S (*shell*) e P

(*protruding*) unidos por uma dobradiça (Figura 1.5). O domínio S fica localizado na porção N-terminal e é o responsável pela forma icosaédrica do capsídeo viral. O domínio P interage em dímeros, conferindo ainda mais estabilidade ao capsídeo, além de formar protruções observadas no vírion quando analisados ao microscópio eletrônico (ME). O domínio P é subdividido em dois subdomínios, P1 e P2. O subdomínio P2 contém uma região hipervariável que tem papel importante na ligação com receptor celular e na atividade antigênica, além de ser responsável pela interação com o sistema histo-sanguíneo ABO, que está associado com a susceptibilidade à infecção por NoV. A proteína VP2 possui aproximadamente 268 aa e está presente no vírion em uma ou duas cópias (Figura 1.5). A região da proteína entre os aminoácidos 108 e 152 compreende o domínio de interação com a proteína VP1. Sua sequência nucleotídica é altamente variável entre as diferentes estirpes virais. Está envolvida com a encapsidação do RNA viral e estabilização dos dímeros da proteína VP1, auxiliando na resistência à degradação por proteases. A VP2 atua ainda na manutenção da estabilidade do RNA da ORF2 e, desta forma, na regulação dos níveis de expressão da proteína VP1 (Prasad et al., 1999; Hardy, 2005; Bertolotti-Ciarlet et al., 2003; Tan & Jiang, 2005).

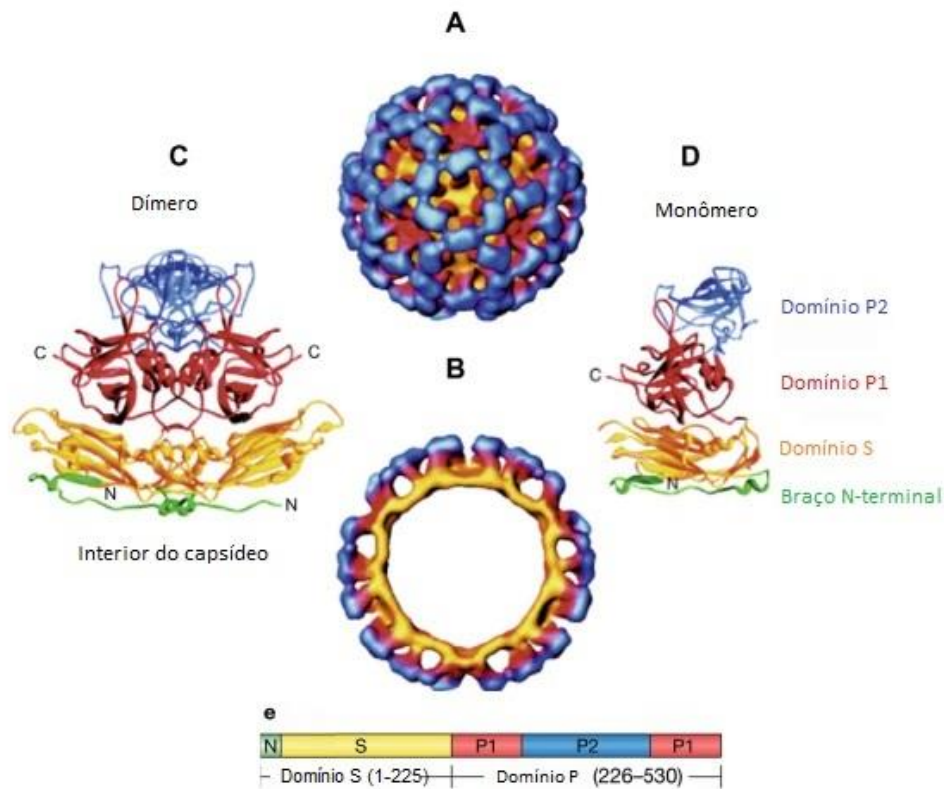


Figura 1.5: Estrutura do capsídeo de uma partícula de Norwalk-like vírus. (A) Representação da superfície do capsídeo viral; (B) corte transversal do capsídeo; (C) Dímero da proteína VP1 do capsídeo viral. Noventa dímeros formam a proteína VP1 inteira; (D) Monômero da proteína VP1 do capsídeo viral. Cada monômero é dividido em domínios (S e P) e subdomínios (P1 e P2); (E) representação das posições dos domínios S, P1, P2 da VP1 na ORF2. Adaptado Scipioni (2008) e Tan & Jiang (2007).

1.4- Características físico-químicas

Os NoV mantêm sua infecciosidade a pH 2.7 durante três horas a temperatura ambiente, a tratamento com éter 20% por 18°C por 18 horas e a exposição a temperatura de 60°C por 30 minutos (Dolin et al., 1972). Esses vírus têm capacidade de flutuação em cloreto de céσιο de 1,33 a 1,41 g/cm³ e se mostraram mais resistentes a tratamento por

cloro do que os poliovirus tipo 1, rotavírus humanos e símios e bacteriófagos F1 (Keswick et al., 1985). Também são resistentes ao tratamento com íons de cloro a uma concentração 3.75 a 6.25 mg/L; a mesma utilizada em sistemas de distribuição de água de consumo. Os NoV podem ser inativados pelo tratamento com íons de cloro na concentração de 10mg/L (Green et al., 2007).

Estudos recentes documentaram a redução de NoV felinos e murinos em 4 log₁₀ após exposição a hipoclorito de sódio a 5.000 p.p.m em período de cerca de 4 minutos (Park et al., 2006). Outros estudos têm documentado a eficácia do tratamento com hipoclorito de sódio na desinfecção de superfícies ambientais contaminadas por NoV, sendo recomendado extensivamente na descontaminação de superfícies (Doultree et al., 1999; Park et al., 2007). Produtos que contém compostos fenólicos, como triclosan e compostos de amônio quaternário, são menos eficazes contra vírus não envelopados, como os NoV (Eleraky et al., 2002, Jimenez et al., 2006; Park et al., 2007). A inativação por radiação ultravioleta é dose dependente (280 – 320 nm) para os calicivírus caninos e felinos e a pasteurização a 62°C por 30 minutos e 70°C por 2 minutos se mostraram eficazes na inativação desses vírus. Foi observado ainda que se mantêm estáveis em pH ≤ 3 ou ≥ 7 e após 30 minutos expostos a etanol 70% (Duizer et al., 2004).

O CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) recomenda o uso de solução de hipoclorito a 1000 a 5000 p.p.m. (5 a 25%) para a desinfecção de superfícies ambientais não porosas ou outro produto que esteja registrado na lista disponibilizada pela EPA (*Environmental Protection Agency*) (EPA, 2012). Entretanto, devido a impossibilidade de propagar NoV humanos em cultivos celulares, a eficácia de muitos produtos utilizados na inativação dos NoV devem ser interpretadas com cautela, pois grande parte dos estudos são realizados baseados na investigação de calicivirus felinos ou NoV murinos, os quais apresentam propriedades físico-químicas diferentes das

pertencentes aos NoV humanos e portanto podem não apresentar a mesma eficácia na desinfecção (CDC, 2011). Hewitt e colaboradores (2009) demonstraram que NoV humanos GI e GII reduzem apenas 0,8 log₁₀ pela exposição a temperatura de 63°C após 5 minutos ou 72°C após dois minutos, enquanto que NoV murinos reduzem 1 log₁₀. Essas observações demonstraram que os NoV humanos são mais resistentes à inativação por calor do que NoV murinos, o que indica que a extrapolação de parâmetros de inativação dos NoV deve ser cautelosa.

1.5-Ciclo replicativo

Devido à ausência de sistema de cultivo celular ou modelo animal que possibilitem a replicação viral, pouco se conhece a respeito do ciclo replicativo dos NoV humanos. No entanto, o conhecimento sobre estratégias de replicação de outros vírus RNA polaridade positiva e estudos sobre a replicação de calicivirus felinos têm fornecido importantes informações sobre a replicação dos NoV humanos (Green et al., 2007).

Os NoV humanos reconhecem antígenos de superfície presentes em células epiteliais de mucosa e eritrócitos de humanos, os antígenos histo-sanguíneos (HBGA). HBGA são carboidratos ligados a proteínas ou lipídios da superfície celular e sua síntese é controlada pelas enzimas fucosiltransferases (*FUT1*, 2 e 3). Essas enzimas são codificados por genes polimórficos ABO, Lewis e secretor. Indivíduos que possuem o gene *FUT2* (cerca de 80% da população) selvagem são considerados secretores e são susceptíveis à infecção por NoV, indivíduos com o gene *FUT2* nulo (cerca de 20% da

população) não são secretores e são resistentes à infecção por NoV (Lindesmith et al., 2003).

A adsorção dos NoV ocorre pelo subdomínio P2 da proteína VP1 do capsídeo viral com a ligação ao antígeno de superfície celular HBGA. O vírus entra na célula e seu genoma é liberado no citoplasma. A proteína Vpg ligada à extremidade 5' do RNA viral interage com a maquinaria de tradução celular e a tradução é então iniciada. A poliproteína codificada pela ORF é clivada pela 3CL^{pro} nas proteínas virais não estruturais (Sosnovtsev et al., 2003). As ORF1 e ORF2 são traduzidas a partir do RNA genômico e subgenômico, dando origem a VP1 e VP2 respectivamente (Hardy, 2005). Da mesma forma que ocorre em outros vírus RNA de polaridade positiva, replicação do RNA viral está associada à membrana da célula hospedeira. A síntese da fita de RNA de polaridade negativa é iniciada a partir da extremidade 3' tendo como molde o RNA genômico, para isso a proteína VPg é uridilada e funciona como um iniciador. É a partir das fitas de RNA de polaridade negativa que novas fitas de RNA genômico e subgenômico serão sintetizadas (Neill & Mengeling, 1988; Gutiérrez-Escolano et al., 2000). Não existem muitas informações que elucidem aspectos do empacotamento, maturação e liberação das partículas de NoV, entretanto a apoptose induzida por mudanças na membrana celular foi associada como um dos mecanismos que facilitam liberação das partículas virais (Sosnovtsev et al., 2003; Green et al., 2007).

1.6-Manifestações clínicas, patogênese e tratamento

O período de incubação do NoV é de 24 a 48 horas, com resolução dos sintomas de 12 a 72 horas, podendo durar até 6 dias (Estes et al., 2006; Glass et al., 2009; Karst, 2010). Diversos estudos demonstram que a taxa de indivíduos assintomáticos pode variar de 12 a 30% podendo representar uma importante fonte de infecção (García et al., 2006; Amar et al., 2007; Ferreira et al., 2008). Adultos infectados experimentalmente podem eliminar o vírus de quatro a oito semanas em média, e pode ser detectado por RT-PCR por até três semanas após o surgimento dos sintomas em 25% de pessoas infectadas (Cheesbrough et al., 1997; Rockx et al., 2002; Atmar et al., 2008). Em pacientes imunocomprometidos esse período pode durar meses ou até mesmo anos (Gallimore et al., 2004; Simon et al., 2006; Frange et al., 2012). Pacientes, sintomáticos ou não, que eliminam o vírus de forma crônica elevam o risco de surtos e contaminações nosocomiais, além de possibilitarem o aumento da diversidade viral intra-hospedeiro (Sukhrie et al., 2010; Wingfield et al., 2010; Bull et al., 2012).

Os sintomas da infecção por NoV incluem diarreia e vômito, podendo ser acompanhado de dor abdominal, náuseas cefaleia, mialgia e febre baixa (Glass et al., 2009; Karst, 2010). O vômito é relativamente prevalente em crianças menores de um ano de idade enquanto que em crianças maiores de um ano a diarreia é o principal sintoma (Rockx et al., 2002; Lopman et al., 2004). Em grupos de risco como lactantes, crianças menores de cinco anos e imunocomprometidos, as manifestações podem ser mais graves e duradouras, aumentando a probabilidade de desidratação (Zintz et al., 2005; Kirkwood & Streitberg, 2008; Glass et al., 2009; Westhoff et al., 2009). Da mesma forma, em pacientes idosos a infecção por NoV pode ser agravada, resultando até mesmo em óbito (Mattner et al., 2006; CDC, 2007). Pacientes com doença

inflamatória intestinal podem apresentar diarreia sanguinolenta se infectados por NoV (Khan et al., 2009).

Devido a falta de um sistema de cultura de células e de um modelo animal que possibilitem a infecção por NoV humanos, todo o conhecimento adquirido sobre sua patogênese é proveniente de observações clínicas, estudos histológicos e bioquímicos a partir de voluntários humanos infectados (Blacklow et al., 1972; Schreiber et al., 1974; Troeger et al., 2009). Recentemente, estudos com bovinos, suínos e murinos têm auxiliado no entendimento da patogênese dos NoV (Cheetham et al., 2006; Mumphrey et al., 2007; Troeger et al., 2009). Algumas das alterações histológicas da mucosa intestinal de um indivíduo infectado incluem o alargamento e encurtamento das vilosidades, aumento da vacuolização citoplasmática, edema celular e hiperplasia das células da cripta (Blacklow et al., 1972; Schreiber et al., 1973; Schreiber et al., 1974; Troeger et al., 2009). Alguns estudos sugerem que o NoV induza apoptose celular em humanos, suínos e murinos (Cheetham et al., 2006; Mumphrey et al., 2007; Troeger et al., 2009).

O tratamento para a GA provocada por NoV é a reidratação oral e reposição de eletrólitos se o paciente estiver capaz de beber líquidos. Caso o paciente apresente vômito e desidratação grave, a reidratação deve ser feita com fluidos intravenosos. Em casos muito críticos em adultos, além da reidratação, podem ser administrados fármacos anti-secretores e atimotilidade (Glass et al., 2009). Nenhum antiviral contra NoV foi desenvolvido, embora tenha sido observado que interferons e ribavirina inibam de forma eficaz a replicação desses vírus (Chang et al., 2007).

1.7- Prevenção e controle

Algumas medidas de prevenção podem diminuir os riscos de infecção por NoV como a higiene das mãos com água e sabão, principalmente após usar o banheiro e trocar fraldas de bebês, antes de fazer refeições ou de manipular alimentos. Desinfetantes à base de álcool podem ser utilizados, mas não como substitutos da lavagem das mãos. Alimentos como frutas e verduras devem ser lavados e moluscos filtradores devem ser cozidos completamente. Superfícies de preparo de alimento devem ser desinfetadas, utensílios de cozinha, toalhas e uniformes devem ser lavados. (CDC, 2011)

O controle da contaminação de alimentos, água, superfícies ambientais e fômites, assim como a higiene adequada de manipuladores de alimentos é fundamental na redução da transmissão de NoV (Glass et al., 2009). É recomendado o afastamento de manipuladores de alimentos infectados por no mínimo 3 dias após a resolução dos sintomas e, para evitar a transmissão pessoa-pessoa, adultos e crianças infectados devem se manter afastados das atividades escolares e de trabalho pelo mesmo período de tempo. Após episódios de vômito e diarreia, superfícies contaminadas devem ser desinfetadas com solução de hipoclorito a 5-25% ou 1000 a 5000 p.p.m. (CDC, 2011). Após um ou surto ou epidemia com duração prolongada, interromper o funcionamento de estabelecimentos como navios de cruzeiro, resorts, acampamentos e restaurantes é essencial para evitar a exposição de uma nova população de susceptíveis (Patel et al., 2009).

Em hospitais e unidades de saúde as superfícies, equipamentos e fômites devem ser desinfetados periodicamente com produtos que possuam atividade contra NoV (CDC, 2011), cuja listagem foi disponibilizada pela EPA (EPA, 2012). Precauções com

pacientes infectados por NoV devem ser aumentadas pelos profissionais de saúde, evitando o trânsito entre áreas clínicas e contato com pacientes imunocomprometidos, assim como devem intensificar a higiene frequente das mãos e utilização de EPIs (Equipamentos de Proteção Individual). As roupas, lençóis, toalhas e uniformes contaminados devem ser lavados prontamente em água quente, acima de 60°C ou com solução de hipoclorito (5-25%) (CDC, 2011).

1.7.1-Imunidade e vacina

Os primeiros estudos sobre imunidade contra NoV humanos, demonstraram imunidade protetora de curta duração após infecção por esses vírus (Wyatt et al., 1974; Parrino et al., 1977).

Lindesmith e colaboradores demonstraram o envolvimento de imunoglobulinas da classe IgA de mucosa e de antígenos HBGA na resposta precoce, conferindo proteção contra infecções por NoV e a secreção de interferon gama (INF- γ) por células TCD4⁺ em voluntários resistentes à infecção por NoV (Lindesmith et al., 2003, 2005). Outros estudos demonstraram a produção de IgM e IgG contra NoV, onde a IgM possui curta duração, assim como a IgA, enquanto que a IgG persiste por meses após a infecção (Graham et al., 1994; Brinker et al., 1999; Lindesmith et al., 2005).

Estudos com anticorpos séricos demonstraram que anticorpos da classe IgG contra NoV são genogrupo-específicos, embora ocorra reatividade cruzada intergenótipos pelo cruzamento da resposta contra estirpes heterólogas dentro do mesmo genótipo (Rockx et al., 2005; Cannon et al., 2009; Reeck et al., 2010; Lindesmith et al., 2010, 2011).

Na última década, novas variantes de GII.4 vêm sendo identificadas e associadas ao aumento do número de surtos, como aconteceu no período de 2002 a 2003 e 2006 a 2007 (CDC, 2011). Períodos de epidemias por NoV GII.4 estão correlacionado com a entrada de novas variantes antigenicamente distintas das anteriores que em anos posteriores o número de surtos diminui. Essa alternância entre períodos de grande número de surtos com posterior diminuição pode indicar a obtenção de imunidade coletiva na população que estaria atuando como importante regulador da evolução dos NoV GII.4 (Buesa et al., 2002; Adamson et al., 2007; Okada et al., 2007; Siebenga et al., 2007a, 2007b; Lindesmith et al., 2008; Johansen et al., 2008; Tu et al., 2008; Donaldson et al., 2010; Boon et al., 2011). Ainda não foi elucidado porque algumas variantes se tornam pandêmicas e outras não. Entretanto, alguns estudos levantam hipóteses como a de que mutações na região P2 do capsídeo viral, que contém o sítio de ligação com antígeno celular HBGA, combinado com a expansão da população susceptível pode ser responsável pela emergência de variantes pandêmicas (Donaldson et al., 2010; Lindesmith et al., 2011). Uma teoria recente, baseada na descoberta de que diferentes estirpes de NoV possam ter diferentes padrões de ligação com antígeno HBGA e pessoas não secretoras desse antígeno não seriam susceptíveis a infecção por certos genótipos ou variantes (Lindesmith et al., 2003). A imunidade coletiva de curta duração contra os NoV impulsiona a evolução de estirpes emergentes contudo, o declínio dessa imunidade possibilita que indivíduos susceptíveis possam ser reinfectados com vírus homólogos por um longo período (Bull & White, 2011). Estudos com variantes de GII.4 corroboram essa explicação quando demonstram que as variantes de 2002-2005 apresentam perfis de ligação diferentes das variantes anteriores de 1974-1997, em contraste com a variante de 2006 que possui perfil de ligação

semelhante a variantes de 1994-1997 (Donaldson et al., 2008; Bok et al., 2009; Karst, 2010).

Devido à falta de um sistema de cultura de células capaz de propagar e manter os NoV humanos, não é possível determinar a capacidade de neutralização nem mesmo a duração de anticorpos específicos para estes vírus. Recentemente, estudos sugeriram uma correlação entre susceptibilidade, HBGA e status secretório desse receptor, onde ocorre a interação vírus-célula, e genes codificantes desse receptor estão envolvidos com a susceptibilidade/resistência à infecção por NoV (Glass et al., 2009; Tan & Jiang, 2007, 2011). Um estudo baseado na inibição da ligação de capsídeos virais vazios denominados VLPs (*Virus Like-Particles*) demonstrou que, em infecções experimentais e naturais com NoV humanos, há produção de anticorpos séricos específicos que bloqueiam a ligação VLP-HBGA, o que estaria correlacionado com a diminuição do risco de desenvolver gastroenterite por NoV (Reeck et al., 2010). Em contraste outros estudos mostram que, altos níveis de anticorpos preexistentes não oferecem proteção contra uma nova infecção (Johnson et al., 1990). A imunidade adquirida após uma infecção têm sido relatada com duração entre 6 meses e dois anos, em estudos com infecção experimental em humanos (Johnson et al., 1990; Reeck et al., 2010).

As VLPs têm sido apontadas como as principais candidatas a vacina, desde sua primeira descrição (Jiang et al., 1992) Estudos pré-clínicos mostraram que VLPs são imunogênicas quando administradas via parenteral, oral ou intranasal e que anticorpos séricos e de mucosa foram induzidos (Ball et al., 1999; Estes et al., 2000; Tacket et al., 2003; El-Kamary et al., 2010). Vacinas intranasais de VLPs que foram avaliadas em estudos, mostraram que esta forma de administração apresenta diversas vantagens, tais como: a fácil administração, é segura e bem tolerada, é imunogênica e promove o estímulo de células dendríticas de mucosa (El-Kamary et al., 2010; Atmar et al., 2012;

Ramirez et al., 2012). El-Kamary e colaboradores (2010) demonstraram a presença de anticorpos IgA e IgG circulantes específicos para NoV, mostrando que a imunização intranasal é capaz de induzir uma resposta imune sistêmica e de mucosa, incluindo a atividade de células efectoras mesmo distante do sítio de infecção. Atmar e colaboradores (2011) testaram a eficácia dessa vacina e observaram que indivíduos receptores, aumentaram em quatro vezes a secreção de IgA específico e obtiveram anticorpos suficientes para bloquear a ligação VLP-HBGA. Outro estudo com vacina intranasal com VLPs demonstrou a indução de resposta específica de células B de memória secretoras de IgA e IgG sugerindo uma imunidade protetora de longa duração (Ramirez et al., 2012). Alguns autores sugerem que a administração parenteral pode aumentar a frequência da resposta sérica, assim como a magnitude de anticorpos e, que esta forma de administração pode ser uma alternativa, se a eficácia da resposta imune protetora for comprovada (Atmar et al., 2012). O uso de plantas transgênicas na expressão de VLPs permite a imunização oral através da ingestão de alimentos como batatas, folhas de tabaco (Mason et al., 1996) e tomates desidratados (Zhang et al., 2006) com a vantagem de não haver necessidade de purificação das VLPs. Folhas de tabaco e batatas transgênicos que expressam VLPs foram capazes de induzir resposta humoral e de mucosa em camundongos vacinados (Mason et al., 1996). Estudo semelhante com tomates transgênico mostrou que esta via de imunização possibilitou a soroconversão com produção de IgG e IgA de mucosa intestinal (Zhang et al., 2006).

A variabilidade genética dos NoV e a substituição de estirpes pandêmicas constituem um importante obstáculo no desenvolvimento de uma vacina eficaz. A evolução rápida e contínua desses vírus sugere a necessidade de um processo de seleção anual de estirpes, semelhante ao que acontece com vacinas para o vírus influenza para que as estirpes vacinais coincidam com as estirpes de NoV circulantes (Karst, 2010).

Desta forma, se faz necessário um sistema de vigilância dos NoV para que sejam identificadas as estirpes circulantes e as prevalentes, auxiliando na avaliação das estirpes que devem ser incluídas na vacina.

1.8- Epidemiologia

Os NoV acometem indivíduos de todas as idades, o que raramente acontece com outros vírus gastroentéricos. Entretanto, a incidência é maior entre crianças menores de cinco anos de idade e idosos (Pang et al., 2000; Rockx, et al., 2002; Glass et al., 2000; Hall et al., 2011). Infecções por NoV ocorrem o ano todo, embora alguns estudos detectem picos de infecção em determinados meses do ano. Em países de clima temperado a ocorrência de infecções por NoV pode acontecer no inverno e períodos mais secos (Fankhauser et al., 1998; Iritani et al., 2002; Hasman et al., 2004; Fretz et al., 2005, Matthews et al., 2012). Em países de clima tropical não existe um padrão de sazonalidade bem definido (Borges et al., 2006; Soares et al., 2007; Victoria et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Ferreira et al., 2010a, 2010b; Georgiadis et al., 2010).

Diversos fatores, tais como: dose infectante baixa (18 a 10^3 partículas virais), eliminação de grande concentração de partículas virais (10^5 a 10^{11} partículas virais/grama de fezes) por indivíduos infectados e a resistência à exposição ao meio ambiente, garantem a fácil disseminação dos NoV (Atmar et al., 2008; Teunis et al., 2008; Lopman et al., 2012).

A transmissão pessoa-pessoa é descrita como a principal forma de transmissão tanto em casos de surto quanto em casos esporádicos (Phillips et al., 2010; Verhoef et al., 2010; Lopman et al., 2012). A maioria dos surtos de GA causados por NoV são

descritos em locais confinados e com grandes aglomerações, tais como: cruzeiros marítimos (Isakbaeva et al., 2005; Wikswo et al., 2011), *resorts* (Doménech-Sánchez et al., 2011; Arvelo et al., 2012), escolas (CDC, 2008; Kimura et al., 2012), hospitais (Georgiadou et al., 2011; Rhinehart et al., 2012), universidades (CDC, 2009), creches (Götz et al., 2002; Gallimore et al., 2004; Akihara et al., 2005), asilos (Lai et al., 2012; Thouillot et al., 2012; Trivedi et al., 2012) e acampamentos militares (Wadl et al., 2010; Yap et al., 2012). Muitos destes surtos são vinculados a episódios de vômitos de pessoas infectadas, sendo esta uma importante via de transmissão, uma vez que a infecção por NoV está associada a uma alta frequência de vômito (Caul, 1994; Lopman et al., 2002, 2011a; Thornley et al., 2011).

Fômites e superfícies contaminadas podem ser também uma via de transmissão (Clay et al., 2006, Lopman et al., 2011b, 2012). Estudos demonstram que os NoV são resistentes e as partículas virais podem permanecer infecciosas por duas semanas em superfícies ambientais e até dois meses em água. Com base em observações, quanto mais seco e frio o ambiente, mais tempo os vírus permanecem infecciosos (Cheesbrough et al., 1997, Teunis et al., 2008; Seitz et al., 2011). Em hospitais, centros médicos, casas de repouso e enfermarias a contaminação ambiental e de fômites é facilitada não só pelo confinamento, mas pelas condições limitadas dos pacientes como a imobilidade e incontinência fecal (Clay et al., 2006; Blaney et al., 2011; Otter et al., 2011; Lopman et al., 2011b, 2012). Somente nos Estados Unidos, 63% dos surtos causados por NoV de 2010 a 2011 ocorreram em unidades de saúde (CDC, 2011).

A transmissão alimentar ocorre pela ingestão de moluscos bivalves, frutas e vegetais contaminados (Patterson et al., 1997; Korsager et al., 2005; Maunula et al., 2009; Vivancos et al., 2009; Wadl et al., 2010; Yu et al., 2010; CDC, 2011; Sarvikivi et al., 2012). Nos Estados Unidos os NoV são os principais agentes causadores de surtos

por transmissão alimentar e o segundo mais comum em hospitalizações (CDC, 2011; Scallan et al., 2011, Hall et al., 2012). Surtos de NoV também são associados a contaminação de sistemas de água de consumo e de recreação causados por inundações, infiltrações com água contaminada ou pelo mal funcionamento do sistema de tratamento de água (Cannon et al., 1991; Kukkula et al., 1999; Lopman et al., 2002; Hewitt et al., 2007; Okoh et al., 2010; Arvelo et al., 2012).

Alguns estudos sugerem a transmissão zoonótica dos NoV devido a alta similaridade de sequencias de estirpes suínas e bovinas com estirpes humanas (Sugieda et al., 1998, 2002; Dastjerdi et al., 1999; Liu et al., 1999; Lopman et al., 2002; Wang et al., 2005; Etherington et al., 2006). Estirpes semelhantes às de NoV GII.4 foram encontradas em fezes e carne de suínos, o que pode ser resultado de uma recombinação de um vírus suíno e um humano em uma animal coinfestado ou de uma transmissão direta dos vírus entre humanos e suínos e vice-versa (Mattison et al., 2007). A replicação de NoV GII.4 foi demonstrada em suínos infectados experimentalmente, os quais desenvolveram sintomas que foram associados à infecção (Cheetham et al., 2006). Souza e colaboradores (2008) demonstraram em seu estudo que bovinos eram susceptíveis a infecção por NoV GII.4 e que, além de haver replicação viral e desenvolvimento de sintomas da infecção, esses animais eliminavam vírus em suas fezes em um período de 4 dias. Esses estudos demonstram que apesar de não haver evidência suficiente para afirmar uma transmissão zoonótica dos NoV, existe a probabilidade de que haja transmissão interespecie e de possa haver coinfecção entre vírus animais e humanos, possibilitando recombinação entre eles. E ainda, a possibilidade de algum animal poder atuar como reservatório para NoV humanos é uma importante questão de saúde pública envolvida na transmissão zoonótica.

1.8.1- Distribuição geográfica

Em países desenvolvidos estima-se que os NoV causem 64.000 hospitalizações e 900.000 episódios de diarreia/ano que requerem visita clínica (Patel et al., 2008). Em países em desenvolvimento, o número de hospitalizações alcança um milhão e o número de mortes chega a 200.000/ano em crianças menores de cinco anos de idade. A prevalência de diarreia grave por NoV chega a 12% em ambas as situações (Patel et al., 2008). Apenas nos Estados Unidos, é estimado que ocorram por ano cerca de 21 milhões de casos de GA causadas por NoV e cerca de um quarto dos mesmos são atribuídos a transmissão alimentar (CDC, 2011; Scallan et al., 2011).

Um recente estudo de revisão demonstrou que em ambulatórios e hospitais de países desenvolvidos e em desenvolvimento, os NoV foram apontados como agente etiológico de cerca de 10 a 15% dos casos graves de GA em crianças menores de cinco anos e de, aproximadamente, 9 a 15% dos casos de diarreia leve e moderada em pessoas de todas as idades (Hall et al., 2010). Dados da Europa e dos Estados Unidos revelam que aproximadamente 36% a 59% dos surtos de GA são causados por NoV (Patel et al., 2008). Somente no ano de 2009 na Inglaterra foram registrados 2300 surtos de GA relacionados aos NoV, acometendo cerca de 24.000 pacientes (HPA, 2012). Um estudo com crianças mexicanas sintomáticas e assintomáticas revelou que 29,8% das crianças estavam infectadas por NoV, sendo 56% por GII e que 30% dos casos positivos eram de crianças assintomáticas (García et al., 2006).

Estudos conduzidos em diversos países da América Latina revelam que os NoV estão envolvidos com altas taxas de infecção em casos esporádicos e de surto de GA, variando entre 12 e 53%. Embora tenham sido detectados GI e GII, o GII é apontado como o responsável pela maioria das infecções, com frequência de até 88% dos casos

postivos (O’Ryan et al., 2000; Bereciartu et al., 2002; Martinez et al., 2002; Vidal et al., 2005; Bucardo et al., 2008, 2011; Gomes et al., 2008).

A maioria dos surtos e casos esporádicos estão associados ao GII, sobretudo ao GII.4 (Bull et al., 2010; CDC, 2011; Lindesmith et al., 2011; Matthews et al., 2012). Um estudo recente que avaliou a forma de transmissão e frequência de GI e GII em surtos, sugeriu que GI está mais associado à transmissão por água do que por outras formas de transmissão, enquanto que GII está mais envolvido com surtos de transmissão alimentar e pessoa-pessoa (Matthews et al., 2012). Esses resultados corroboram estudos que demonstram que partículas virais de NoV GI são menos estáveis em superfícies do que GII (Liu et al., 2009) e que partículas de GI são mais estáveis na água do que GII (Charles et al., 2009; Seitz et al., 2011).

Um estudo na Austrália no período de 2006 a 2008 detectou 36% de NoV em casos de GA em crianças, sendo o GII.4 o genótipo mais prevalente seguido do GII.3, que foi o prevalente no ano de 2007 (Mahar & Kirkwood, 2011). Outros estudos demonstraram a relevância do GII.3 em pacientes pediátricos no mesmo período, em outros países como China, Japão e Vietnã onde GII.3 foi dominante no período de 2005 a 2006 e na Índia no ano de 2007 (Phan et al., 2007; Nguyen et al., 2008; Chhabra et al., 2009; Jin et al., 2009).

Devido a pouca investigação sobre NoV GIV, ainda não existem muitas informações epidemiológicas e moleculares sobre esses vírus. Contudo, alguns estudos detectaram a presença desses vírus em amostras clínicas de humanos, em amostras animais e ambientais (Lindell et al., 2005; Zintz et al., 2005; La Rosa et al., 2008, 2010). Vinjé e Koopmans (2000) detectaram NoV GIV pela primeira vez, sugerindo que duas estirpes, que não agruparam filogeneticamente com GI e GII, poderiam ser um novo genótipo denominado Alphanon. Em 2002, outro estudo detectou esse novo

genótipo em 1% dos surtos que ocorreram nos Estados Unidos no período de 1997 a 2000 e sugeriram a criação de um novo genogrupo (GIV) (Fankhauser et al., 2002). Estudos posteriores detectaram a presença desse genótipo na Suécia (Lindell et al., 2005), na Itália (La Rosa et al., 2008, 2010, 2012) e Japão (Iritani et al., 2002; Kitajima et al., 2010, 2011). Recentemente foi descrito o genoma completo de NoV GIV.1 detectado em surtos que ocorreram em asilos na Austrália (Eden et al., 2012).

1.8.1.1- Norovirus no Brasil

Os NoV foram descritos pela primeira vez no Brasil em um estudo que demonstrou a presença destes vírus em fezes de crianças sintomáticas e assintomáticas em São Paulo, no período de 1987 a 1988 (Timenetsky et al., 1993). Estudos soropidemiológicos em comunidades indígenas e comunidades carentes da região norte e nordeste, demonstraram soroprevalência que variaram de 36 a 100% (Gabbay et al., 1994; Talal et al., 2000).

Outros autores, utilizando técnicas moleculares de detecção viral demonstraram uma alta frequência de infecção por NoV em indivíduos de diversos grupos etários em diferentes regiões do país (Parks et al., 1999; Borges et al., 2006; Ferreira et al., 2010a). Na região Sudeste, a alta frequência de infecção e a grande diversidade genética dos NoV foi observada em diferentes cidades, sendo o GII o mais frequentes, sobretudo o GII.4 (Gallimore et al., 2004; Castilho et al., 2006; Soares et al., 2007; Victoria et al., 2007; Andreasi et al., 2008; Nakagomi et al., 2008; Ribeiro et al., 2008; Xavier et al., 2009; Ferreira et al., 2008, 2010a, 2012a; Fioretti et al., 2011).

A importância da infecção por NoV em pacientes pediátricos em diversos estados do Brasil foi evidenciada em estudos que revelaram taxas de infecção similares ou até mesmo superiores às observadas para os RV-A (Parks et al., 1999; Gallimore et al., 2001; Borges et al., 2006, Castilho et al., 2006; Soares et al., 2007; Victoria et al., 2007; Andreasi et al., 2008; Nakagomi et al., 2008; Ribeiro et al., 2008; Xavier et al., 2009; Ferreira et al., 2012a). Foi demonstrado ainda que a gravidade das manifestações clínicas causadas pela infecção por NoV pode ser comparada às relacionadas aos RV-A (Nakagomi et al., 2008).

Os dados relativos à sazonalidade dos NoV no Brasil ainda são contaditórios. No Rio de Janeiro, Soares e colaboradores (2007) não encontraram nenhum padrão de sazonalidade em um estudo de seis anos (1998 a 2005). Entretanto, em estudos realizados no Espírito Santo e Rio de Janeiro foi evidenciado uma sazonalidade em meses secos (Victoria et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Ferreira et al., 2010a; Georgiadis et al., 2010). Em contraste, outros estudos brasileiros encontraram maior detecção em períodos de alta umidade (Borges et al., 2006; Ferreira et al., 2010b).

1.8.2-Variantes de norovirus GII.4

O período de 1995 a 2006 foi marcado por pandemias em que o NoV GII.4 foi o principal responsável devido a emergência de variantes deste genótipo (Siebenga et al., 2009). Durante este período, a variante US95/96 foi responsável por cerca de 50% dos surtos nos Estados Unidos e 85% na Holanda (Vinjé et al., 1997). Em 2002 a variante US95/96 foi substituída pela variante *Farminton Hills* (ou variante 2002), que causou surtos em vários países e foi associada a 80% dos surtos nos Estados Unidos

(Fankhauser et al., 2002; Lopman et al., 2004; Widdowson et al., 2004). No início do ano de 2004 surge a variante GII.4 *Hunter*, detectada na Europa, Austrália e Ásia (Bull et al., 2006; Kroneman et al., 2006; Phan et al., 2006). Essa variante foi substituída em seguida por duas outras, associadas a um grande aumento no número de surtos, que cocircularam nos Estados Unidos e Europa durante o ano de 2006, as variantes identificadas como 2006a (*Laurens*) e 2006b (*Minerva*) (Kroneman et al., 2006; CDC, 2007; Siebenga et al., 2008; Lindesmith et al., 2011). No final do ano de 2009 e início de 2010 uma nova variante pandêmica surgiu (variante 2010 ou *New Orleans*), e tem circulado atualmente em diversos países. Cerca de 60% dos surtos de outubro de 2009 a março de 2010 por NoV nos EUA foram causados por essa variante (Vega et al., 2011a).

Recentemente uma nova variante denominada Sydney 2012, relacionada com a variante 2010, foi descrita em casos de infecções por NoV relatados na rede de vigilância internacional de NoV NoroNet. Em países como a França, Austrália, Inglaterra, Nova Zelândia e Japão têm sido observado o aumento de surtos e casos esporádicos desde novembro de 2012, que podem estar associados a esta variante (Bennett et al., 2013; van Beek et al., 2013)

1.8.3-Vigilância

A fim de ampliar o conhecimento sobre as tendências geográficas e temporais e a disseminação de novas variantes de NoV, o Instituto Nacional de Saúde Pública e Meio Ambiente da Holanda, criou uma rede onde cientistas de instituições de saúde e universidades podem partilhar informações epidemiológicas e moleculares sobre os

NoV, a Noronet (Noronet, 2012). Três redes de vigilância molecular desses vírus estão interligadas nesse sistema de vigilância eletrônica: Calicinet dos Estados Unidos, a rede de vigilância da Austrália e Nova Zelândia e a rede *Food-borne Viruses in Europe* (FBVE). Dentre as atividades envolvidas com a rede NoroNet estão o monitoramento de NoV GII.4, criação de nomenclaturas padronizadas para o NoV, envio de e-mails rápidos com alertas e informações sobre novas variantes, compartilhamento de dados epidemiológicos e moleculares. Está disponível ainda uma ferramenta de genotipagem automática pela da inserção de sequências do genoma de NoV que fornece a identificação de estirpes e variantes de GII.4 (Kroneman et al., 2011).

A rede CaliciNet é coordenada pelo CDC e promove a integração entre laboratórios públicos dos Estados Unidos, com o objetivo de elucidar surtos através da identificação de modo de transmissão, evolução do surto, identificação de variantes (CDC, 2011).

Ainda nos Estados Unidos, a rede NORS (*National Outbreak Reporting System*) fornece um sistema nacional integrado de vigilância de surtos de doenças entéricas de transmissão hídrica, doenças por transmissão alimentar, por contato com animais ou contato pessoa-pessoa (NORS, 2012).

A FBVE foi criada com o objetivo de fornecer dados epidemiológicos, virológicos, moleculares e de diagnóstico de surtos de gastroenterites virais e hepatites A e E, tanto para fins de pesquisa quanto de vigilância epidemiológica (Duizer et al, 2008).

Na Inglaterra uma rede de vigilância on line, a HPA (*Hospital Norovirus Outbreak Reporting Tool*) foi criada para que surtos de NoV em hospitais fossem relatados, fornecendo informações como estimativas de número de surtos, detecção de

surgimento de novas variantes epidêmicas e auxiliar na melhor compreensão do impacto da doença causada por NoV (HPA, 2012).

As ferramentas de vigilância eletrônica possibilitam a obtenção de dados epidemiológicos e moleculares de casos de surtos e casos esporádicos causados por NoV, permitindo o melhor entendimento do impacto desses vírus na saúde pública, além de fornecer informações importantes sobre a circulação de genótipos e variantes, essenciais para o desenvolvimento de uma vacina.

1.9-Diagnóstico laboratorial

A Microscopia Eletrônica (ME) assim como a imunomicroscopia eletrônica (IME) foram utilizadas no diagnóstico de calicivirus humanos, contudo devido a necessidade de grande concentração do vírus nas fezes para sua avaliação, somada a ampla diversidade dos NoV e a reduzida especificidade dos anticorpos utilizados, esta técnica deixou de ser utilizada (Glass et al., 2000; Atmar et al., 2001).

Como alternativa para substituição da IME foram desenvolvidas outras técnicas imunológicas como a técnica hemaglutinação por imunoaderência (IAHA), radiomunoensaio (RIE) e ensaios imunoenzimáticos (EIE), utilizadas para detectar antígenos e anticorpos, possibilitando estudos de soroprevalência em diferentes populações. Entretanto, a dificuldade de se obter anticorpos para NoV, por serem vírus não propagáveis em cultivos celulares, sempre foi um obstáculo para a realização de técnicas imunológicas (Greenberg & Kapikian, 1978; Kapikian et al., 1978; Atmar et al., 2001).

Em 1992, Jiang e colaboradores clonaram o genoma dos NoV e desenvolveram um sistema de expressão da proteína VP1 do capsídeo viral em baculovírus, utilizados como vetores de expressão. Esse sistema de expressão permitiu obtenção de capsídeos virais vazios (VLPs), que se mostraram morfológicamente e antígenicamente similares aos NoV nativos. Essas VLPs foram utilizadas tanto como antígenos em testes ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), como também para imunizar animais para a obtenção de anticorpos. Desta forma, os testes de ELISA se tornaram mais acessíveis e mais sensíveis. Mas, apesar do grande avanço conquistado com as VLPs, devido a ampla diversidade genética e antigênica dos NoV, a taxa de detecção ainda é baixa (Lopman et al., 2002). Em caso de surtos, embora não seja capaz de identificar o genogrupo ou genótipo do vírus, esta técnica se torna aplicável como um teste de triagem, combinado com testes mais sensíveis e específicos como os testes moleculares, pode diminuir o tempo e reduzir o custo do diagnóstico (Jiang et al., 1992, 1993, 2000; Atmar et al., 2001; Lopman et al., 2002; Richards et al., 2003).

Descrita a primeira vez por Jiang e colaboradores (1992) e De Leon e colaboradores (1992), a detecção de NoV pela técnica de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) é a mais amplamente utilizada a partir de amostras fecais. Quando avaliada e comparada com as técnicas de ME, IME, RIE e EIE, a RT-PCR se mostrou a mais específica e mais sensível na detecção desses vírus (Glass et al., 2000; Bruin et al., 2006; Zheng et al., 2006, Castriciano et al., 2007).

A diversidade genética dos NoV torna difícil a síntese de iniciadores capazes de detectar todos os genogrupos e genótipos. Iniciadores utilizados para detecção de NoV têm como alvo a região mais conservada do gen da RdRp, localizada na extremidade 3' da ORF1, compreende as regiões denominadas A e B e são capazes de detectar NoV GI e GII. Para a detecção simultânea dos genogrupos GI, GII é necessário utilizar uma

mistura com os iniciadores específicos para cada genogrupo (Ando et al., 1995; Green et al., 1995; Vinjé e Koopmans, 1996; Le Guyader et al., 1996; Fankhauser et al., 2002). Entretanto, o uso desses iniciadores para análise filogenética e classificação dos NoV se mostrou ineficaz, sendo portanto utilizados majoritariamente para detecção (Zheng et al., 2006).

O sequenciamento nucleotídico completo da ORF2 que codifica o gen da proteína VP1 do capsídeo viral é utilizado como padrão para a caracterização molecular de genótipos e estudos filogenéticos dos NoV (Zheng et al., 2006). Contudo, por ser uma região grande do genoma viral, com aproximadamente 1600 pares de bases, essa metodologia se torna laboriosa e de alto custo. Como opção mais prática e menos custosa, existem múltiplos iniciadores que têm como alvo regiões menores da ORF2. Alguns desses iniciadores flanqueiam regiões denominadas C e E (extremidade 5' da ORF2) e outros a região D (extremidade 3' da ORF2) sendo utilizados para a caracterização dos genogrupos (G) e genótipos (GG) de NoV (Noel et al., 1997; Kojima et al., 2002; Vinjé et al., 2004).

Para a caracterização molecular de variantes de GII.4 é realizado o sequenciamento completo da ORF2 (Zheng et al., 2006). Como alternativa para esta metodologia, Vega e colaboradores (2011a) desenvolveram um protocolo de amplificação que utiliza iniciadores que tem como alvo a região codificante do subdomínio P2 da proteína VP1 do capsídeo viral. A maioria das mutações entre genótipos e variantes ocorrem nessa região, assim é possível distinguir variantes de GII.4, diminuindo o tamanho do fragmento a ser sequenciado (Vega et al., 2011a).

A PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) é mais vantajosa em relação à PCR convencional, pois economiza tempo e custo, diminui o risco de contaminação pela menor manipulação do produto de PCR, apresenta maior sensibilidade e

especificidade, além de possibilitar a quantificação viral nas amostras (Kageyama et al., 2003). A qRT-PCR foi desenvolvida inicialmente para quantificar separadamente NoV GI e GII. Os iniciadores utilizados tinham como alvo a região na junção da ORF1 e ORF2, que é considerada a região mais conservada do genoma viral (Kageyama et al., 2003). Posteriormente, Pang e colaboradores (2005) utilizaram os mesmos iniciadores usados no ensaio monoplex em um formato multiplex que foi desenvolvido para a detecção e quantificação simultânea de NoV GI e GII, diminuindo o tempo e custo do ensaio. Mais recentemente foi desenvolvido o qRT-PCR multiplex como o sistema TaqMan, para a detecção dos NoV GI e GII simultaneamente e que permite a genotipagem direta a partir do produto da qRT-PCR. Entretanto a sensibilidade desse teste é menor quando comparada ao ensaio monoplex (Schultz et al., 2011).

2-Justificativa

O grande impacto das infecções por NoV na saúde pública tem sido demonstrado pela distribuição global destes vírus, que são os principais responsáveis por surtos de GA, tanto em países desenvolvidos como naqueles onde as condições sanitárias e de higiene da população não são adequadas (Vinjé et al., 1996; Noel et al., 1999; Ponka et al., 1999; Daniels et al., 2000; Patel et al., 2008). No Brasil, apesar dos estudos realizados em diferentes regiões do país demonstrarem a alta prevalência e a grande diversidade destes vírus, ainda não existe uma rede de vigilância laboratorial ativa para o diagnóstico dos NoV (Gabbay et al., 1994; Castilho et al., 2006; Campos et al., 2008; Ferreira et al., 2010a, 2010b; Fioretti et al., 2011).

Desde o ano de 2004, o Centro de Referência Regional em Rotavíruses do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) realiza o diagnóstico dos casos de GA com suspeita de infecção por RV-A provenientes do estado do Rio Grande do Sul (RS). Porém foi verificado que um grande número de surtos apresentou resultado negativo para este vírus, o fato que determinou a investigação dos NoV, considerando a relevância dos mesmos como causa mais importante de surtos de GA. No estado do RS há somente um estudo que relata a detecção apenas de NoV GII em Porto Alegre, com valores de 13,2% (Georgiadis et al., 2010). Nesse sentido, o presente estudo visa contribuir com dados epidemiológicos e moleculares associando pela primeira vez a diversidade genética dos NoV, incluindo variantes GII.4, com os surtos ocorridos no RS.

O NoV GII.4 tem se destacado como o principal agente envolvido em pandemias que se estabelecem a intervalos regulares pelo surgimento de novas variantes deste genótipos (Fankhauser et al., 1998; Koopmans et al., 2001; Ferreira et al., 2008, 2010b;

Zheng et al., 2010; Fioretti et al., 2011). A rápida evolução e disseminação destes vírus demandam estudos frequentes que determinem a distribuição geográfica e prevalência, com o objetivo de se estabelecer medidas para prevenção de surtos e fornecer dados que possam contribuir com o desenvolvimento de uma vacina eficaz no controle das GA provocadas por NoV.

3-Objetivos

3.1-Objetivo geral

Realizar estudo epidemiológico de surtos de GA associados a NoV, ocorridos no estado do RS no período de 2004 a 2011, pela detecção e caracterização molecular destes vírus em genótipos e variantes de GII.4.

3.2-Objetivos específicos

1-Utilizar métodos moleculares de amplificação genômica em espécimes clínicos obtidos no período de estudo para determinar a prevalência de NoV no estado do RS.

2-Correlacionar a prevalência dos NoV detectados na população estudada com variáveis sócio-demográficas e clínicas.

3-Characterizar os genótipos de NoV pelo sequenciamento nucleotídico parcial de regiões do genoma que codificam para principal proteína do capsídeo viral (regiões C e D).

4-Characterizar as variantes de NoV GII.4 pelo sequenciamento nucleotídico parcial do genoma que codifica para principal região antigênica da proteína do capsídeo viral (P2).

4-Material e métodos

4.1-Aspectos éticos

Este estudo faz parte de um projeto que abrange diagnóstico, vigilância e epidemiologia molecular de vírus causadores de GA aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz – CEP: 311/06 (Anexos).

4.2-Área de estudo

O estado do Rio Grande do Sul possui 10.693.029 habitantes. Possui uma área territorial de 268.781,896 Km², e compreende 496 municípios agrupados em 35 microrregiões, que formam sete mesorregiões, sendo elas: Centro Ocidental Rio-grandense, Centro Oriental Rio-grandense, Metropolitana de Porto Alegre, Nordeste Rio-grandense, Noroestes Rio-grandense, Sudoeste Rio-grandense (IBGE, 2010) (Figura 4.1).

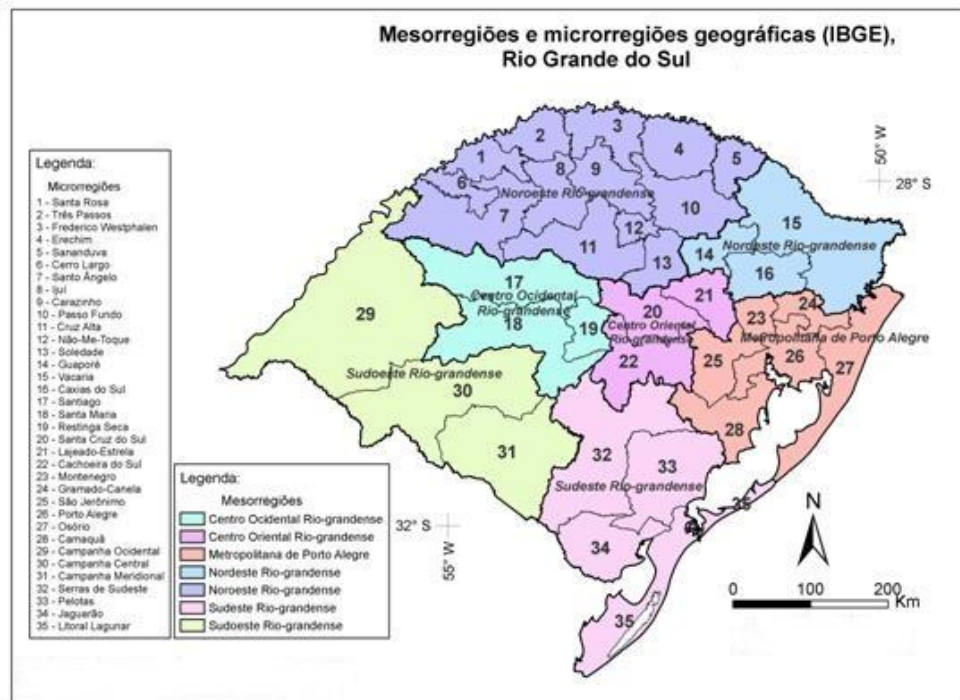


Figura 4.1: Mapa das 35 microrregiões e sete mesorregiões do Estado do Rio Grande do Sul. Fonte: FEE (Fundação de Economia e Estatística, 2012).

4.3-Espécimes clínicos e fluxograma para estudos de epidemiologia dos norovirus

Para este estudo foram selecionadas 2.265 amostras de fezes, provenientes de 741 surtos de GA ocorridos no RS que foram enviadas pelo Laboratório Central (LACEN) daquele estado ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) para esclarecimento dos surtos. Os surtos foram caracterizados pelo LACEN-RS seguindo à definição da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, que define surto de doença diarréica aguda (DDA) como o aumento do número de casos acima do limite esperado para a população envolvida naquele período específico (SVS/MS, 2013). No LVCA, as amostras foram testadas e negativas pela técnica de

eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e ELISA para detecção de rotavírus A (RV-A). A Figura 4.2 apresenta as metodologias empregadas para detecção de NoV nestas amostras.

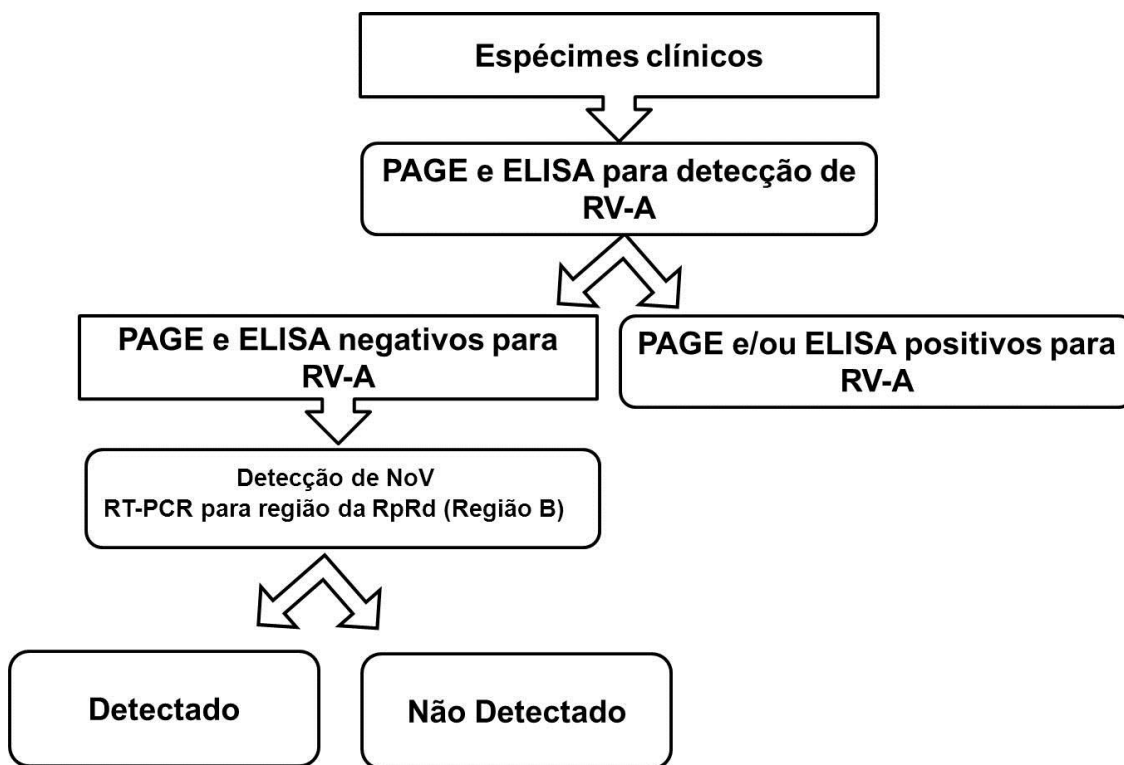


Figura 4.2: Fluxograma de metodologias utilizadas na detecção de norovírus (NoV).

4.4-Espécimes clínicos para caracterização molecular

Para o estudo de caracterização molecular dos NoV foram selecionadas amostras de fezes previamente positivas para NoV pela RT-PCR.

Para que houvesse uma representatividade geográfica e temporal as amostras foram selecionadas por sorteio aleatório com o auxílio do programa Excel 2010 (Microsoft Office). Devido ao grande número de amostras, os municípios do estado foram agrupados em sete mesorregiões, segundo divisão estabelecida pelo IBGE

(Figura 4.1). Foram sorteados 50% dos municípios de cada mesorregião, dos quais foi selecionada uma amostra/ano. Todas as amostras sem informação de município foram excluídas do grupo de seleção. Critérios de origem como quadro clínico, hospitalizações e grupo etário dos pacientes não foram considerados para a seleção. A Figura 4.3 apresenta as metodologias utilizadas para caracterização molecular destas amostras.

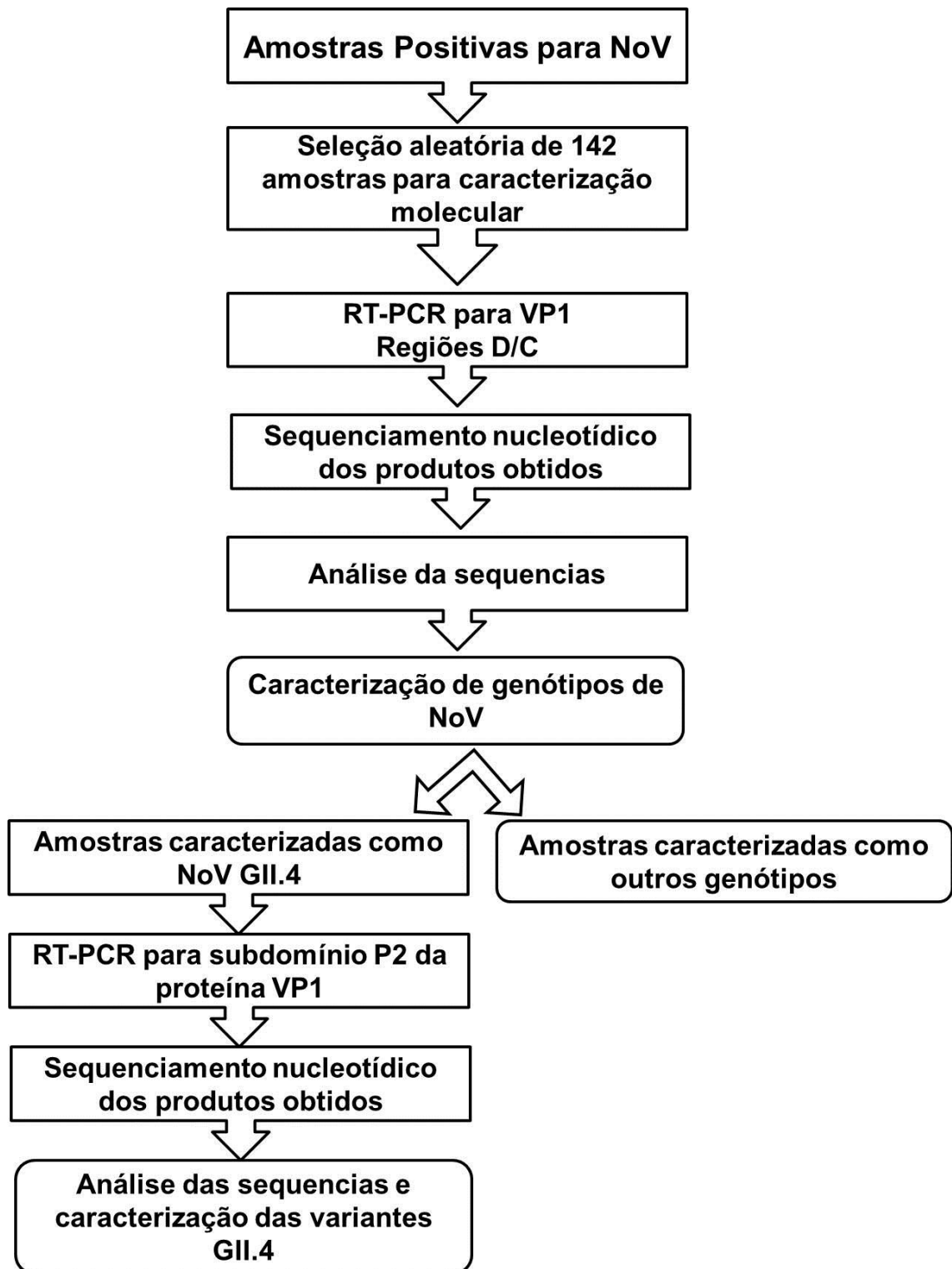


Figura 4.3: Fluxograma de procedimentos para genotipagem de norovirus (NoV) e caracterização molecular das variantes de NoV GII.4.

4.5-Suspensão fecal

Foram preparadas suspensões fecais a 10 % em tampão Tris/HCl/Ca⁺²(0,01M; pH7,2). Após homogeneização de 5ml de tampão Tris/HCl/Ca⁺² com, aproximadamente 0,5g de fezes, a solução foi centrifugada a 3000 x g por 20 minutos e o sobrenadante recolhido e congelado a -20°C.

4.6-Extração do RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada com a metodologia do Kit *QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN[®], Valencia, CA, USA), segundo as instruções do fabricante. O RNA foi armazenado a -70°C para posterior síntese de DNA complementar (cDNA).

4.7-Reação de transcrição reversa para obtenção de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do cDNA foi utilizada a metodologia do kit *High Capacity[®] cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA), segundo as instruções do fabricante. Foi utilizada ainda a metodologia com a transcriptase reversa *SuperScript[®]III* (Invitrogen[™], Carlsbad, CA, USA) e iniciadores randômicos *Random primers* (Invitrogen[™]). Para esta última metodologia, foram adicionados 2 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) a 10 µL de RNA viral extraído, e essa mistura foi submetida a 97°C por 7 minutos para desnaturação. Em seguida, foram adicionados 38 µL da

mistura de reagentes (Quadro 4.1) e submetidos à temperatura de 42°C por uma hora e 95°C por 10 minutos em termociclador MJ Research™ Modelo PTC-100 (MJ Research™, Alameda, CA, USA). O produto foi estocado em freezer a -20°C ou a -70°C até o momento da PCR.

Quadro 4.1: Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa (RT) para a obtenção de cDNA a partir do RNA viral extraído, utilizando o protocolo da SuperScript®III.

Reagentes*	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O livre de DNAase/RNAase	-	23,5 µL
Tampão de PCR sem MgCL ₂	10X	5µL
dNTPs:dATP,dTTP, dGTP, dCTP	2,5mM cada	4 µL
MgCL ₂	50mM	2,5 µL
RT SuperScript®III	200U/µL	1 µL
Iniciador <i>Random primers</i>	50 µM	2 µL

*Invitrogen™

4.8-Deteccção e caracterização molecular dos norovirus pela reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR)

4.8.1-Iniciadores para reação em cadeia pela polimerase (PCR)

O Quadro 4.2 apresenta os iniciadores utilizados nos protocolos de PCR para detecccção e caracterização molecular dos NoV. Todas as reações foram realizadas em termociclador MJ Research™ Modelo PTC-100 (MJ Research™).

Quadro 4.2: Iniciadores utilizados na reação em cadeia da polimerase para amplificação do genoma de norovírus humano.

Iniciadores	Sequência (5' - 3') ^a	Orientação	Localização	Região	Posição no Genoma
Iniciadores Genéricos para detecção de NoVb					
Mon431 ^f	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	+	RNA Pol ^c	B	5093-5112 ⁱ
Mon432 ^e	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	+	RNA Pol	B	5093-5112
Mon433 ^f	GAA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	-	RNA Pol	B	5285-5305
Mon434 ^e	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	-	RNA Pol	B	5285-5305
Iniciadores Degenerados para classificação em Genogrupos^d					
Cap Ae	GGC WGT TCC CAC AGG CTT	-	VP1	D	6897-6914 ^f
Cap B2 ^e	TAT GTI GAY CCW GAC AC	+	VP1	D	6738-6754
Cap B1 ^e	TAT GTT GAC CCT GAT AC	+	VP1	D	6738-6754
Cap C ^f	CCT TYC CAK WTC CCA YGG	-	VP1	D	6667-6684 ^L
Cap D3 ^f	TGY CTY ITI CCH CAR GAA TGG	+	VP1	D	6432-6452 6432-6451
Cap D1 ^f	TGT CTR STC CCC CAG GAA TG	+	VP1	D	
Iniciadores Específicos para classificação em Genogrupos^g					
G1SKFe	CTGCCCGAATTYGTAAATGA	+	VP1	C	5342-5361 ⁱ
G1SKRe	CCAACCCARCCATTRTACA	-	VP1	C	5671-5689
G2SKF ^f	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	+	VP1	C	5058-5076 ^L
G2SKR ^f	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	-	VP1	C	5401-5423
Iniciadores Específicos para a caracterização de variantes de GI.4^h					
EVP2F	GTR CCR CCH ACA GTT GAR TCA	+	VP1	P2	5730-5750 ^L
EVP2R	CCG GGC ATA GTR GAY CTR AAG AA	-	VP1	P2	6381-6403

^a Código IUPAC para indicar as posições degeneradas: I: iosina, R: purina (A/G), Y: pirimidina (C/T), S: C/G, I: A/T/C/G, W: A/T, K: G/T, H: A/T/C

^b Referência: Beuret et al., 2002

^c Pol, Polimerase

^d Referência: Vinjé et al., 2004

^e Genogrupo I

^f Genogrupo II

^g Referência: Kojima et al., 2002

^h Referência Vega et al., 2011a

ⁱ: de acordo com o vírus referência M87661, ^J: de acordo com o vírus referência NC001959; ^L: de acordo com o vírus referência X86557.

4.8.2-Deteccção dos norovírus pela reacção em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) para amplificação da região parcial da ORF1- Região B

Para deteção dos NoV foi realizada PCR utilizando iniciadores para amplificação da região B, região parcial da ORF-1 que codifica a RpRd (Beuret et al., 2002) (Quadro 4.2). Para a reacção de PCR foram adicionados 5µL de cDNA em 20 µL da mistura de reagentes (Quadro 4.3). A mistura foi submetida à temperatura de desnaturação de 94°C por 3 minutos e 40 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/30segundos), anelamento (50°C/1minuto), extensão (60°C/1minuto) e um ciclo de extensão final (72°C/7 minutos).

Quadro 4.3: Reagentes utilizados na reacção em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação parcial da ORF1 (Região B).

Reagentes *	Concentração	Volume/Reacção
H ₂ O livre de DNAase/RNAase	-	14,1 µL
Tampão de PCR sem MgCL ₂	10X	2,5 µL
dNTPs:dATP,dTTP, dGTP, dCTP	2,5mM cada	2 µL
MgCL ₂	50mM	0,8 µL
Taq DNA Polimerase	5U/µL	0,3µL
Mistura de iniciadores Mon 431,432, 433, 434	100 µM	0,3µL

*Invitrogen™

4.8.3-Characterização molecular dos norovírus pela reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) para amplificação parcial da ORF2 – Região D

Para a genotipagem, foram realizadas PCRs utilizando iniciadores (Quadro 4.2) que amplificam uma região parcial da ORF-2, a região D (Vinjé et al, 2004). Este protocolo de PCR compreende dois conjuntos diferentes de iniciadores, utilizados separadamente para genotipar NoV do grupo GI e outro conjunto para grupo GII. Para a reação de PCR foram adicionados 10 µL de cDNA em 40 µL da mistura de reagentes (Quadro 4.4). A mistura foi submetida à temperatura de desnaturação de 94°C por 3 minutos e 40 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/1minuto), anelamento (40°C/1minuto), extensão (72°C/1minuto) e um ciclo de extensão final (72°C/7 minutos).

Quadro 4.4: Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação parcial da ORF2 (Região D).

Reagentes*	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O livre de DNAase / RNAase	-	26,2 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂	10X	5µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	2,5mM	4µL
MgCl ₂	50mM	1,5 µL
Taq DNA Polimerase	5U/µL	0,3µL
Mistura de iniciadores (GI): Cap A/B1/B2 Mistura de iniciadores (GII) : Cap C/D1/D3	100µM	0,3 µL

*Invitrogen™

4.8.4- Caracterização molecular dos norovírus pela reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) para amplificação parcial da ORF2 – Região C

As amostras que não amplificaram para a região D foram genotipadas por PCR para outra região parcial da ORF-2, a região C (Quadro 4.2). Este protocolo de PCR compreende dois conjuntos diferentes de iniciadores, utilizados separadamente para GI e GII (Kojima et al., 2002). Para a reação de PCR foram adicionados 10 µL de cDNA em 40 µL da mistura de reagentes (Quadro 4.5). A mistura foi submetida à temperatura de desnaturação de 94°C por 3 minutos e 40 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/30 segundos), anelamento (40°C/30 segundos), extensão (72°C/1minuto) e um ciclo de extensão final (72°C/7 minutos).

Quadro 4.5: Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação parcial da ORF2 (Região C).

Reagentes*	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O livre de DNAase / RNAase	-	26,2 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂	10X	5µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	2,5mM	4µL
MgCl ₂	50mM	1,5 µL
Taq DNA Polimerase	5U/µL	0,3µL
Mistura de iniciadores (GI): G1SKR/G1SKF Mistura de iniciadores (GII) : G2SKR/G2SKF	20µM	3µL

*Invitrogen™

4.8.5- Caracterização molecular de variantes de norovírus genótipo GII.4 pela reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) para amplificação parcial da ORF2 – Subdomínio P2

Para a diferenciação de variantes de NoV GII.4 foi realizado um protocolo de amplificação parcial da ORF-2 que tem como alvo a principal região antigênica do capsídeo viral (P2) e parte das duas extremidades do subdomínio P1 (Vega et al., 2011a) (Quadro 4.2). Para a reação de PCR foram adicionados 10 µL de cDNA em 40 µL da mistura de reagentes (Quadro 4.6). A mistura foi submetida à temperatura de desnaturação de 94°C por 2 minutos e 40 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/15 segundos), anelamento (55°C/30 segundos), extensão (68°C/1minuto) e um ciclo de extensão final (68°C/5 minutos).

Quadro 4.6: Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação parcial da ORF2 (Subdomínio P2).

Reagentes	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O livre de DNAase / RNAase	-	25,3 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂	10X	5µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	2,5mM	4µL
MgCl ₂	50mM	1,5 µL
Taq DNA Polimerase	5U/µL	0,2µL
Iniciadores EVP2R e EVP2F	5µM	4µL (2 µL cada)

*Invitrogen™

4.8.6-Análise dos produtos de PCR em gel de agarose

Dez microlitros dos produtos da RT-PCR com 2µL de corante azul de bromofenol 10x *BlueJuice*TM (InvitrogenTM) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X e impregnado com brometo de etídio a uma concentração final de 0,5 µg/mL, por aproximadamente uma hora (120 Volts). Foi utilizado 5µL do padrão de peso molecular de 100 pares de base (pb) (InvitrogenTM) diluído na concentração de 10 ng/µL. Os *amplicons* foram visualizados com o auxílio de um transiluminador (DyNA Light Dual Intensity UV; Labnet National Company), e fotografados em sistema de captura de imagem *Kodak*[®] *Gel Logic 212 Imaging System*, que utiliza o *software Molecular Imaging Kodak*[®] *Standard Edition*.

4.8.7-Purificação e quantificação dos amplicons obtidos

Os produtos amplificados pela PCR foram purificados pela metodologia do *QIAquick*[®] *PCR purification kit* (QIAGEN[®]) quando os produtos apresentaram banda única no gel de agarose. Quando o produto de PCR apresentou bandas inespecíficas, a banda de interesse foi excisada e purificada com o kit *QIAquick Gel Extraction*[®] (QIAGEN[®]), de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, os produtos purificados foram quantificados com a utilização do kit *Quant-iT*TM *dsDNAHS Assay Kit* no espectrofotômetro Qubit[®] *Fluorometer* (InvitrogenTM), de acordo com as instruções do fabricante.

4.8.8-Sequenciamento nucleotídico do genoma viral

Os produtos obtidos pela RT-PCR foram sequenciados com os mesmos iniciadores utilizados na PCR para caracterização de genótipos (iniciadores para regiões C e D) e de variantes de GII.4 (iniciadores para o subdomínio P2) (Quadro 4.2). O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger (dideoxinucleotídeo), com o kit comercial *Big Dye Terminator® v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®) em sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®) na plataforma genômica de sequenciamento PDTIS da FIOCRUZ. Quando não foi possível enviar os produtos purificados à plataforma genômica, a reação de sequenciamento e a precipitação do produto da reação de sequenciamento foram realizados no laboratório (LVCA).

Para a reação de sequenciamento, os produtos de PCR de 177 pb (GI-região D) foram utilizados na concentração de 1-3 ng de DNA; os produtos de 253 pb (GII-regiãoD), 330 pb (GI-região C) e 344 pb (GII-região C) foram utilizados na concentração de 3-10 ng de DNA e para o produto de 673 pb (variantes de GII.4-subdomínio P2) foram utilizados na concentração de 5-20 ng de DNA. Em placas de 96 orifícios, foi aplicada a mistura de reagentes para a reação de sequenciamento (utilizando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* -Applied Biosystems®) (Quadro 4.7) e posteriormente foram aplicados os produtos de PCR purificados. As placas foram cobertas por adesivo, centrifugadas a 180 x g por 30 segundos e submetidas a termociclagem de uma etapa inicial de 96°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, utilizando o termociclador Gene Amp modelo 9700 da Applied Biosystems®.

Após a reação de sequenciamento, os produtos foram precipitados pelo método de isopropanol, como descrito em seguida. As placas foram centrifugadas brevemente; foram adicionados 30 μ L (3x volume) de isopropanol 75% (Merck© Darmstadt, Alemanha) em cada poço da placa; logo depois, as placas foram homogeneizadas por 10 segundos e posteriormente incubadas em repouso por 15 minutos sob abrigo da luz; em seguida foram centrifugadas por 45 minutos a 3.000 x g; o sobrenadante foi descartado com o auxílio de papel-toalha onde as placas foram vertidas; foram adicionados 50 μ L (5x volume) de etanol 75% (Merck) em cada poço; em seguida, as placas foram centrifugadas por 15 minutos a 3.000 x g e o sobrenadante descartado como descrito anteriormente; as placas foram centrifugadas brevemente na posição invertida com o auxílio de um papel toalha para retirar todo o vestígio de etanol. As placas foram cobertas com adesivo e aquecidas a 60°C por 10 minutos, sob abrigo da luz em termociclador Gene Amp da Applied Biosystems®, modelo 9700. As placas secas foram armazenadas, protegidas da luz à -20°C até o momento de serem enviadas à plataforma genômica de sequenciamento PDTIS da FIOCRUZ, onde os produtos foram ressuspensos em formamida Hidi (Applied Biosystems®) e sequenciados.

Quadro 4.7: Reagentes utilizados na reação de sequenciamento nucleotídico do genoma dos norovírus.

Reagentes	Volume/Reação
DNA	0,5-5,0 µL
Tampão de sequenciamento <i>BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5X) Dye</i> ® (Applied Biosystems®)	2µL
<i>Big Dye Terminator</i> ® (<i>Ready Reaction Mix</i>) (Applied Biosystems®)	2µL
Iniciadores (3,2 pmol)	1µL
H ₂ O livre de DNAase / RNAase (Invitrogen™)	-
Volume final	10 µL

4.8.9-Análise das sequencias nucleotídicas

As sequencias nucleotídicas obtidas foram analisadas e editadas no *software BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.9.0 (Hall, 1999). Os alinhamentos das sequencias consenso foram realizados com o programa CLUSTALW (Thompson et al., 1994).

A análise filogenética foi realizada com o *software* o MEGA 5 (Tamura et al., 2011) e as distâncias calculadas entre as sequências foram analisadas pelo algoritmo de *Neighbor-joining*, baseado no método de estimativa de distância evolutiva o modelo de Kimura dois parâmetros para nucleotídeos (Kimura, 1980). A significância estatística das diferentes árvores filogenéticas obtidas foi estimada através de 2000 pseudo-réplicas de valores de confiança para o intervalo dos nós. As sequências protótipos representantes dos diferentes genótipos de NoV de origem humana foram obtidas a partir do GenBank (*NCBI, National Center for Biotechnology Information*) (NCBI,

2012b) mediante a utilização da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (NCBI, 2012a), disponível em *Entrez Pubmed*, ou através seu número de acesso (Quadro 4.8). Alguns números de acesso foram obtidos com o uso da ferramenta on line *Norovirus Genotyping Toll Version 1.0*, que disponibiliza a genotipagem de sequencias de NoV por meio de métodos filogenéticos e fornece o número de acesso de todas as sequencias protótipos utilizados na análise (Kroneman et al., 2011).

Quadro 4.8: Protótipos de norovirus humanos obtidos do *GenBank* utilizados neste estudo com propósito comparativo.

Nº de acesso	Vírus	Genogrupo	Genótipo/Variante	Origem
HQ698901	NoV	I	1	Grécia
M87661	NoV	I	1	Estados Unidos
L07418	NoV	I	2	Reino Unido
JN603244	NoV	I	3	Suécia
AB42808	NoV	I	4	Japão
AJ277614	NoV	I	5	Reino Unido
AJ277615	NoV	I	6	Reino Unido
AJ277609	NoV	I	7	Reino Unido
AF538679	NoV	I	8	Estados Unidos
X81879	NoV	II	2	Reino Unido
EU187437	NoV	II	3	Japão
JX445158	NoV	II	4	Canada
JX047012	NoV	II	4	Brasil
JN595867	NoV	II	4	Estados Unidos
X76716	NoV	II	4	Reino Unido
AY587985	NoV	II	4	Reino Unido
AB294783	NoV	II	4	Japão

FJ383862	NoV	II	4	Rússia
AJ004864	NoV	II	4/1996	Reino Unido
AB303929	NoV	II	4/2001	Holanda
DQ078814	NoV	II	4/2004	Austrália
AY883096	NoV	II	4/2004	Holanda
GQ849126	NoV	II	4/2006a	Austrália
AY502023	NoV	II	4/2002	Estados Unidos
DQ369797	NoV	II	4/2003	China
AB220921	NoV	II	4/2003	Japão
JX459640	NoV	II	4/2010	Austrália
JN595867	NoV	II	4/2010	Estados Unidos
GU445325	NoV	II	4/2010	Estados Unidos
JX459902	NoV	II	4/2010	Austrália
AB445395	NoV	II	4/2008	Holanda
HQ456344	NoV	II	4/2006b	Japão
EF684915	NoV	II	4/2006b	Austrália
EF126965	NoV	II	4/2006b	Holanda
AB541354	NoV	II	4/2006b	Japão
AB447450	NoV	II	4/2006b	Japão
AB294794	NoV	II	4/2006b	Japão
AB039778	NoV	II	6	Japão
JX047018	NoV	II	6	Brasil
AJ277618	NoV	II	12	Reino Unido
AY113106	NoV	II	13	Estados Unidos
FJ264894	NoV	II	14	Rússia
AY130762	NoV	II	15	Estados Unidos
DQ438972	NoV	II	17	Estados Unidos
AB542917	NoV	II	20	Japão
EU019230	NoV	II	21	Índia

4.9-Análise estatística

As análises estatística foram realizadas com o auxílio do programa Epi Info 7 (Dean, 2011). Utilizou-se o teste do qui-quadrado de Pearson sem correção e quando o número de amostras foi menor do que 10 foi utilizado o teste exato de Fisher sem correção. Para a análise dos resultados obtidos por grupo etário foi utilizado o qui-quadrado de tendência linear. O intervalo de significância estatística adotado para diferenças entre casos positivos e negativos foi o p valor menor ou igual a 0,05, considerado estatisticamente significativo.

5-Resultados

5.1- Resultados laboratoriais, aspectos epidemiológicos e clínicos

O NoV foi detectado em 36,1% (817/2265) das amostras estudadas. A distribuição temporal demonstrou maior frequência de detecção em 2006 com 57,8% de positividade (Tabela 5.1, Figura 5.1). Durante o período de 2004 a 2011 ocorreram 741 surtos de GA no estado, sendo o NoV associado a 44,1% (327/741) dos mesmos. Dos 180 surtos descritos no ano de 2006, 109 (60,5%) foram relacionados a este agente.

A mesorregião Metropolitana de Porto Alegre foi a que concentrou maior número de surtos durante o período de estudo (n=142), seguida da mesorregião Noroeste Rio-Grandense, com 101 surtos. As mesorregiões Nordeste Rio-Grandense e Sudeste Rio-Grandense tiveram 55 e 15 surtos, respectivamente. As mesorregiões com menor número de surtos foram a Centro-Oriental Rio-Grandense (n=8) e a Sudoeste Rio-Grandense (n=1) (Tabela 5.1 e Figura 5.1).

Mesorregião									
NºNoV+/estudados(%)	Ano								
Total Nºsurtos NoV/estudados(%)	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total
Centro Ocidental Rio-Grandense	0	0	5/9(55,5)	1/13(7,7)	1/1(100)	0	0	0	7/23(30,4)
	0	0	3/5(60)	1/3(33,3)	1/1(100)	0	0	0	5/9(55,5)
Oriental Rio-Grandense	1/2(50)	3/17(17,6)	33/44(75)	0	3/23(13)	0	0	0	40/86(46,5)
	1/2(50)	2/2(100)	2/6(33,3)	0	3/5(60)	0	0	0	8/15(53,3)
Metropolitana de Porto Alegre	7/44(15,9)	18/65(27,7)	90/203(44,3)	28/133(21,1)	66/201(32,8)	51/167(30,5)	52/184(28,3)	22/128(17,2)	334/1125(29,7)
	3/37(8,1)	10/23(43,5)	28/59(47,4)	15/31(48,4)	23/52(44,2)	20/49(40,8)	27/54(50)	16/40(40)	142/345(41,1)
Nordeste Rio-Grandense	2/21(9,5)	9/38(23,7)	63/117(53,8)	18/45(40)	23/73(31,5)	11/39(28,2)	4/33(12,1)	3/12(25)	133/378(35,2)
	2/11(18,2)	6/14(42,8)	19/32(59,3)	9/16(56,2)	10/20(50)	2/6(33,3)	4/17(23,5)	3/7(42,8)	55/123(44,7)
Noroeste Rio-Grandense	2/6(33,3)	24/83(28,9)	149/230(64,8)	14/55(25,4)	21/72(29,2)	5/35(14,3)	15/39(38,5)	13/20 (65)	243/540(45)
	1/18(5,5)	9/25(36)	48/66(72,7)	12/23(52,2)	14/38(36,8)	1/13(7,7)	9/25(36)	7/10(70)	101/218(46,3)
Sudeste Rio-Grandense	0	0/2	27/36(75)	0/2	6/18(33,3)	2/2(100)	2/8(25)	1/6 (16,6)	38/74(51,3)
	0	0/1	9/10(90)	0/1	2/2(100)	2/2(100)	1/5(20)	1/5(20)	15/26(57,7)
Sudoeste Rio-Grandense	1/12(8,3)	0	0/6	0	0	0	0	0	1/18(5,5)
	1/2(50)	0	0/2	0	0	0	0	0	1/4(25)
Sem Informação de município	3	1	13	0	3	1	0	0	21
Total NºNoV+/estudados(%)	16/88(18,2)	55/206(26,7)	380/658(57,7)	61/248(24,6)	123/391(31,4)	70/244(28,7)	73/264(27,6)	39/166(23,5)	817/2265(36,1)
Total Nºsurtos NoV/estudados(%)	8/70(11,4)	27/65(41,5)	109/180(60,5)	37/74(50)	53/119(44,5)	25/70(35,7)	41/101(40,6)	27/62(43,5)	327/741(44)

Tabela 5.1: Distribuição temporal e geográfica da frequência das infecções e dos surtos causados por norovirus (NoV) no período de 2004 a 2011 nas diferentes mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul.

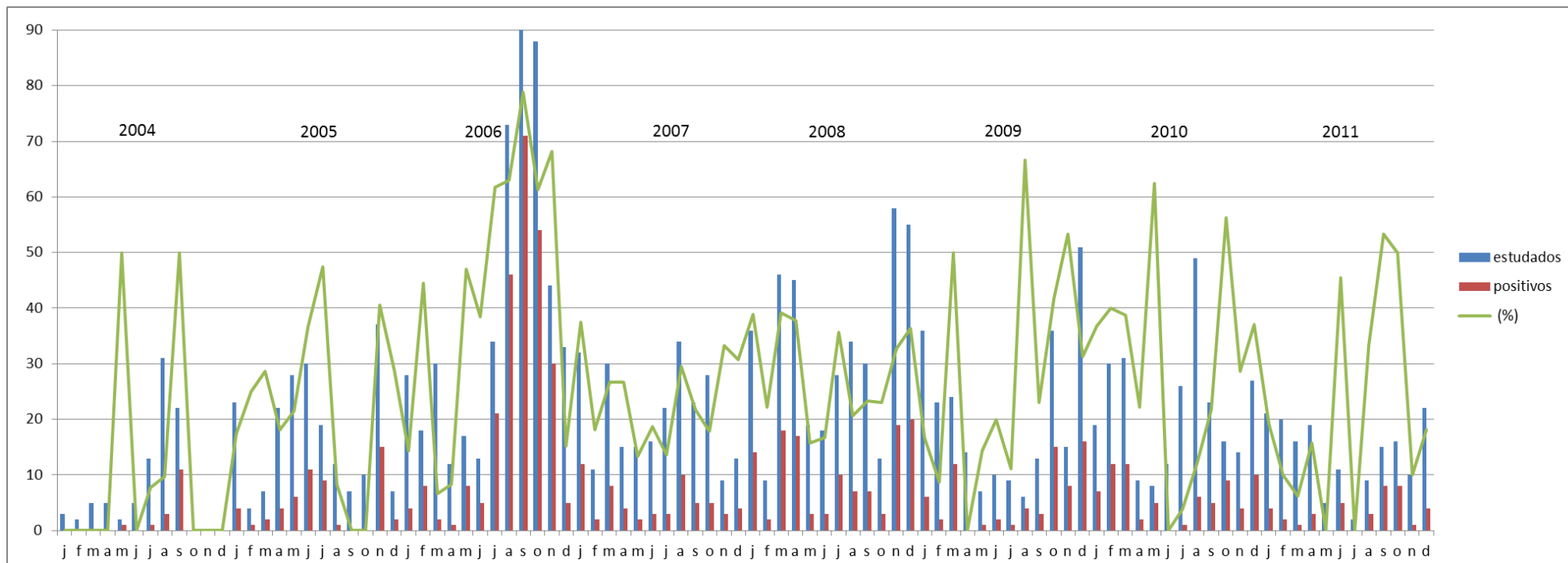


Figura 5.1: Distribuição mensal por ano de casos positivos para norovirus ocorridos no estado do Rio Grande do Sul no período de 2004-2011. *Os valores de casos estudados e positivos ocorridos nos meses de setembro e outubro de 2006 foram representados pela metade para melhor apresentação no gráfico, sem alteração no percentual de detecção. Setembro: 142/180; Outubro 108/176.

A análise temporal de acordo com as estações do ano evidenciou uma sazonalidade significativa ($p < 0,05$) na taxa de detecção de NoV nos meses de primavera e inverno (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Distribuição cumulativa (2004 a 2011) dos casos positivos de norovírus de acordo com as estações do ano.

Estação	No. de amostras positivas/estudadas (%)
Verão	135/504 (26,8)
Outono	86/357 (24,1)
Inverno	307/714 (43)
Primavera	289/690 (41,9)

Foram considerados os meses de janeiro, fevereiro e março como verão; abril, maio e junho como outono; julho, agosto, setembro como inverno e outubro novembro, dezembro como primavera.

Diferenças estatisticamente significativas entre verão e a primavera ($p < 0,05$), verão e inverno ($p < 0,05$), outono e primavera ($p < 0,05$) e outono e inverno ($p < 0,05$). Valor de p: teste do qui-quadrado de Pearson sem correção

A distribuição de casos positivos de acordo com o grupo etário demonstrou que os adultos maiores de 50 anos apresentaram maior taxa de infecção por NoV. Os grupos incluindo crianças de menores de um ano de idade, de um a dois anos e de cinco a dez anos de idade apresentaram as menores taxas de infecção ($\cong 30\%$). Foi observada uma tendência estatisticamente significativa do aumento da taxa de infecção de acordo com o aumento do grupo etário ($p < 0,05$) (Tabela 5.3).

Tabela 5.3: Frequência de detecção de norovirus de acordo com o grupo etário.

Grupo etário	No. de amostras positivas/estudadas (%)
≤ 1 ano	157/514 (30,5)
> 1 ano ≤ 2 anos	153/421(36,3)
> 2 anos ≤ 5 anos	104/344 (30,2)
> 5 anos ≤ 10 anos	50/166 (30,1)
> 10 anos ≤ 20 anos	52/143 (36,4)
> 20 anos ≤ 50 anos	197/472 (41,7)
> 50 anos	94/172 (54,6)
Sem informação	10/33 (30,3)
Total	817/2265 (36,1)

* teste do qui-quadrado para tendência linear; P valor *p < 0,05

Para análise de manifestações clínicas foram utilizadas informações contidas nas fichas epidemiológicas de 932 casos registrados no período de 2004 a 2006. A substituição desta ficha no ano de 2006 resultou em um grande número de dados incompletos, inviabilizando a análise nos anos seguintes.

Vômito e dor abdominal foram as manifestações clínicas mais comuns nos indivíduos infectados por NoV, sendo o vômito mais frequente em todos os grupos etários e dor abdominal no grupo etário de 1 a 10 anos de idade ($p < 0,05$) (Tabela 5.4).

Com menor frequência foram encontrados coriza, sangue, muco, desidratação e febre. A tosse se mostrou mais frequente em indivíduos sem infecção por NoV e maiores de 10 anos de idade ($p < 0,05$). O mesmo acontece com a presença de sangue nas fezes, que é significativamente mais frequente em indivíduos sem infecção e maiores de 10 anos de idade ($p < 0,05$). Diarreia com a presença de muco também foi maior em indivíduos não infectados por NoV no grupo etário de 1 a 10 anos de idade ($p < 0,05$) (Tabela 5.4).

Tabela 5.4: Sinais e sintomas clínicos em pacientes infectados e não infectados por norovírus (NoV), de acordo com o grupo etário no período de 2004 a 2006.

Manifestações	≤ 1 ano			> 1 ano ≤ 10 anos			> 10 anos			Total
	NoV(+) N(%) (n=47)	NoV (-) N(%) (n=71)	P valor	NoV(+) N(%) (n=145)	NoV (-) N(%) (n=225)	P valor	NoV(+) N(%) (n=253)	NoV (-) N(%) (n=191)	P valor	
Muco	11 (23,4)	25 (35,2)	0,17	19 (13,1)	47 (20,9)	0,05	39 (15,4)	28 (14,6)	0,82	169
Sangue	1 (2,1)	6 (8,4)	0,24*	4 (2,7)	12 (5,3)	0,30*	1 (0,4)	14 (7,3)	<0,05 *	38
Febre	20 (42,5)	33 (46,5)	0,67	60 (41,4)	93 (41,3)	0,99	52 (20,5)	50 (26,2)	0,16	308
Vômito	35 (74,5)	38 (53,5)	<0,05	104 (71,7)	112 (49,8)	<0,05	149 (58,9)	85 (44,5)	<0,05	523
Dor Abdominal	20 (42,5)	39 (54,9)	0,18	102 (70,3)	128 (56,9)	<0,05	167 (66,0)	114 (59,7)	0,17	570
Coriza	14 (29,8)	25 (35,2)	0,53	34 (23,4)	59 (26,2)	0,54	22 (8,7)	22 (11,5)	0,32	176
Tosse	12 (25,5)	25 (35,2)	0,26	36 (24,8)	45 (20,0)	0,27	15 (5,9)	24 (12,6)	<0,05	157
Desidratação	1 (2,1)	13 (18,3)	0,80*	19 (13,1)	37 (16,4)	0,38	49 (19,4)	38 (19,9)	0,88	157

*teste do qui-quadrado de Fisher

Amostras com informações ignoradas: 15 amostras no grupo etário ≤ 1 ano e 35 amostras no grupo etário de > 1 ano ≤ 10 anos.

5.2- Caracterização molecular dos norovirus

Com o sequenciamento nucleotídico dos amplicons de PCR das regiões C e D da proteína VP1 foram genotipadas 110 amostras GII e duas amostras GI. O sequenciamento da região D possibilitou a caracterização de duas amostras de GI e 105 GII, enquanto cinco amostras GII foram caracterizadas pela região C. Não foi possível realizar a caracterização de 21,1% das amostras (30/142), pois algumas não amplificaram pela PCR por ambas as regiões e outras apresentaram sequências nucleotídicas de baixa qualidade.

As Figuras 5.2, 5.3 e 5.4 apresentam os resultados da análise filogenética para caracterização dos genótipos de NoV de acordo com as regiões genômicas estudadas. Devido à alta prevalência do genótipo GII.4, apenas sequências representativas de cada *cluster* e ano foram incluídas na árvore da região D, portanto 48 amostras não estão demonstradas.

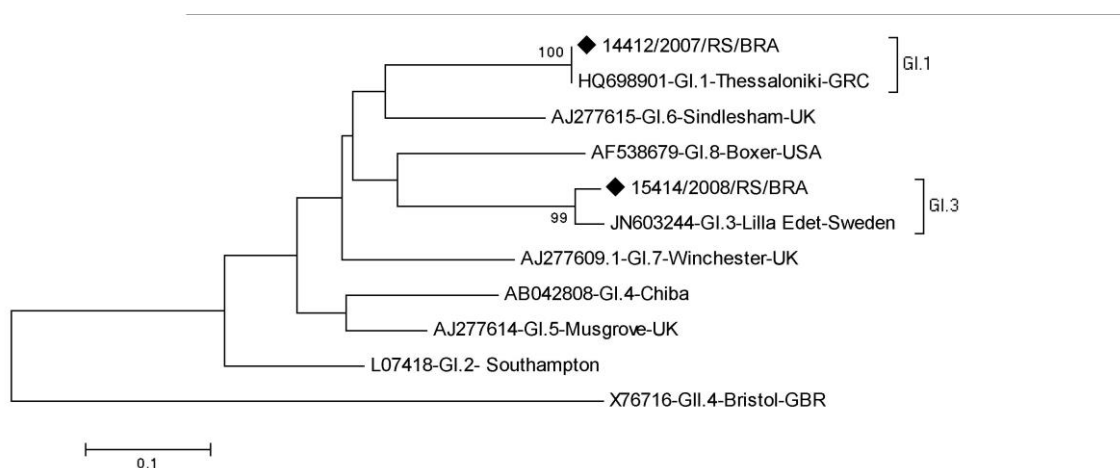


Figura 5.2: Árvore filogenética baseada na análise da região parcial (D) do gene que codifica para a proteína VP1 de duas amostras de norovírus pertencentes ao genogrupo I (GI). Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (142pb) da região codificante da proteína VP1 de norovírus GI, reconstruída a partir do método de *Neighbor-Joining* com o modelo de Kimura 2-parâmetros e réplicas de 2000 *bootstrap*. As amostras estudadas se encontram marcadas com um losango preto. Os valores de *bootstrap* estão indicados na árvore filogenética, valores menores que 70% não estão representados. A barra da parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

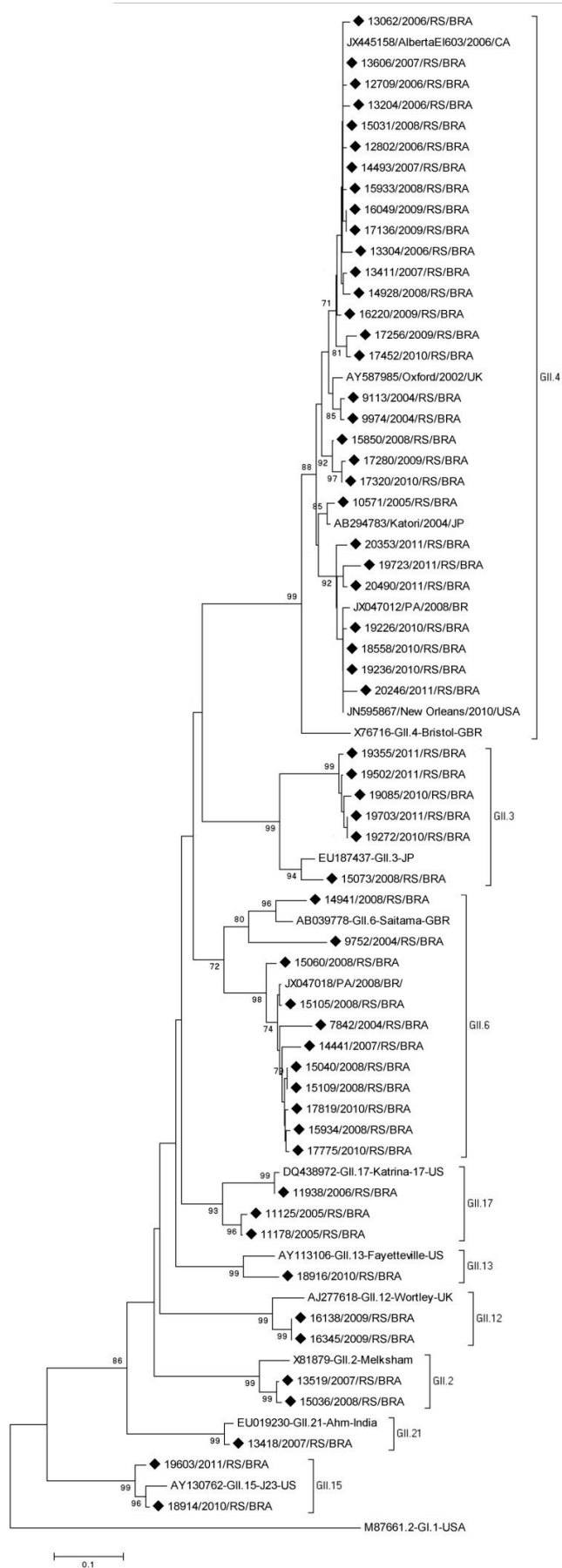


Figura 5.3: Árvore filogenética baseada na análise da região parcial (D) do gene que codifica para a proteína VP1 de 57 amostras de norovírus pertencentes ao genogrupo II (GII). Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (219 pb) da região codificante da proteína VP1 de norovírus GII, reconstruída a partir do método de *Neighbor-Joining* com o modelo de Kimura 2-parâmetros e réplicas de 2000 *bootstrap*. As amostras estudadas se encontram marcadas com um losango preto. Os valores de *bootstrap* estão indicados na árvore filogenética, valores menores que 70% não estão representados. A barra da parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

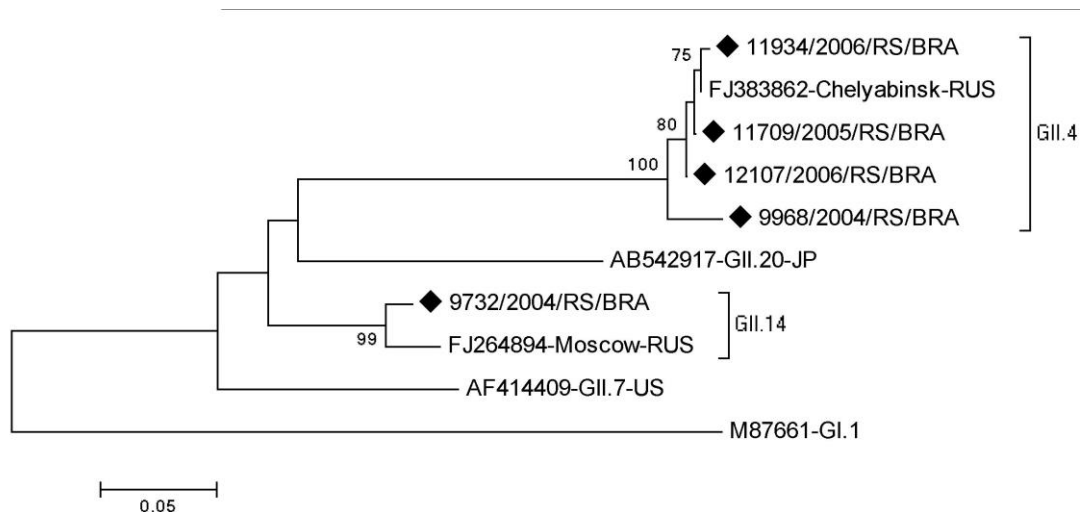


Figura 5.4: Árvore filogenética baseada na análise da região parcial (C) do gene que codifica para a proteína VP1 de 5 amostras de norovírus pertencentes ao genogrupo II (GII). Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica parcial (219 pb) da região codificante da proteína VP1 de norovírus GII, reconstruída a partir do método de *Neighbor-Joining* com o modelo de Kimura 2-parâmetros e réplicas de 2000 *bootstrap*. As amostras estudadas se encontram marcadas com um losango preto. Os valores de *bootstrap* estão indicados na árvore filogenética, valores menores que 70% não estão representados. A barra da parte inferior da figura é proporcional à distância genética.

Do total de 112 NoV genotipados foram caracterizados 12 genótipos circulando no estado do RS no período de estudo. O genótipo mais frequentemente detectado foi o GII.4 (n=81 [72,3%]), seguido GII.6 (n=11 [9,8%]), GII.3 (n=6), GII.17 (n=3), GII.12 (n=2), GII.15 (n=2), GII.2 (n=2), GII.13 (n=1), GII.21 (n=1), GII.14 (n=1). As duas amostras de NoV GI foram genotipadas como GI.1 (n=1) e GI.3 (n=1) (Figura 5.5).

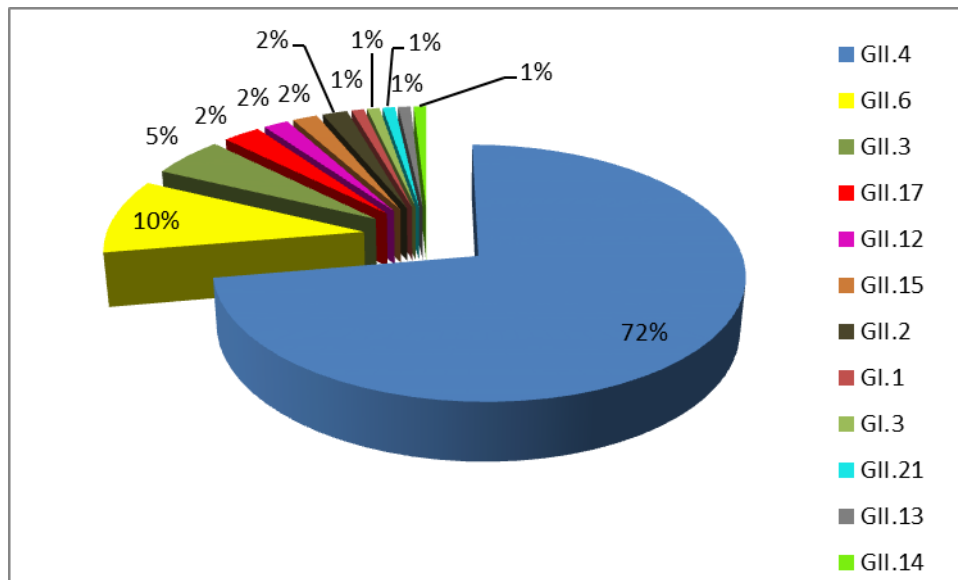


Figura 5.5: Percentual de genótipos de norovírus detectados do estado do Rio Grande do Sul, no período de 2004 a 2011.

Associado a um grande número de casos no estudo, o NoV GII.4 foi encontrado em todos os anos do período estudado, principalmente no ano de 2006, que concentrou 37% (30/81) de todas as amostras de GII.4 detectadas no estudo. Nesse ano, apenas uma amostra (GII.17) foi caracterizada com genótipo diferente de GII.4. A cocirculação de diferentes genótipos de GII foi observada em todos os anos. Os anos em que houve uma maior diversidade na circulação de genótipos foram os anos de 2007, 2008 e 2010, com cinco genótipos diferentes. Nos anos de 2007 e 2008, além dos diferentes genótipos de NoV GII foi detectado também GI (Tabela 5.5). A ampla distribuição geográfica do NoV GII.4 foi evidenciada pela sua detecção em seis das sete mesorregiões do estado. A mesorregião Metropolitana de Porto Alegre apresentou a maior diversidade de genótipos circulantes (n=8), seguida da mesorregião Nordeste Rio-Grandense (n=7) e Noroeste Rio-Grandense (n=5).

Tabela 5.5: Distribuição temporal e geográfica dos genótipos de norovírus no período de 2004 a 2011 nas diferentes mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul.

Mesorregiões	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Centro Ocidental Rio-Grandense	–	–	GII.4(1)	–	GII.6(1)	–	–	–
Oriental Rio-Grandense	GII.4(1)	–	GII.4(2)	–	GII.6(1) GI.3(1)	–	–	–
Metropolitana de Porto Alegre	GII.4(1) GII.14(1)	GII.4(2)	GII.4(6) GII.17(1)	GII.4(1) GI.1(1) GII.21(1)	GII.4(4) GII.6(2) GII.3(1)	GII.4(6)	GII.4(4) GII.3(2) GII.6(1)	GII.4(8) GII.3(2) GII.15(1)
Nordeste Rio-Grandense	–	GII.17(1)	GII.4(5)	GII.4(2)	GII.4(2) GII.6(1) GII.2(1)	GII.4(1) GII.12(1)	GII.4(1) GII.13(1)	GII.4(2) GII.3(1)
Noroeste Rio-Grandense	–	GII.17(1)	GII.4(13)	GII.2(1) GII.4(1) GII.6(1)	GII.4(5)	–	GII.4(2) GII.6(1) GII.15(1)	GII.4(1)
Sudeste Rio-Grandense	–	–	GII.4(3)	–	GII.6(1)	GII.4(1) GII.12(1)	GII.4(1)	GII.4(1)
Sudoeste Rio-Grandense	GII.6(1)	–	–	–	–	–	–	–
Total	4	4	31	8	20	10	14	16

(n): número de amostras genotipadas

5.2.1-Variantes de norovirus GII.4

Todas as 81 amostras de NoV caracterizadas como GII.4 foram submetidas a PCR com iniciadores específicos para a amplificação do subdomínio P2 (Vega et al., 2011a). Não foi possível realizar a caracterização de 35 amostras que não amplificaram na PCR ou apresentaram sequência nucleotídica de baixa qualidade. A análise filogenética das 46 sequências nucleotídicas do subdomínio P2, permitiu a identificação de cinco variantes circulando no estado do RS no período de 2004 a 2011, denominadas: 2003, 2004, 2006a, 2006b e 2010 (Figura 5.6).

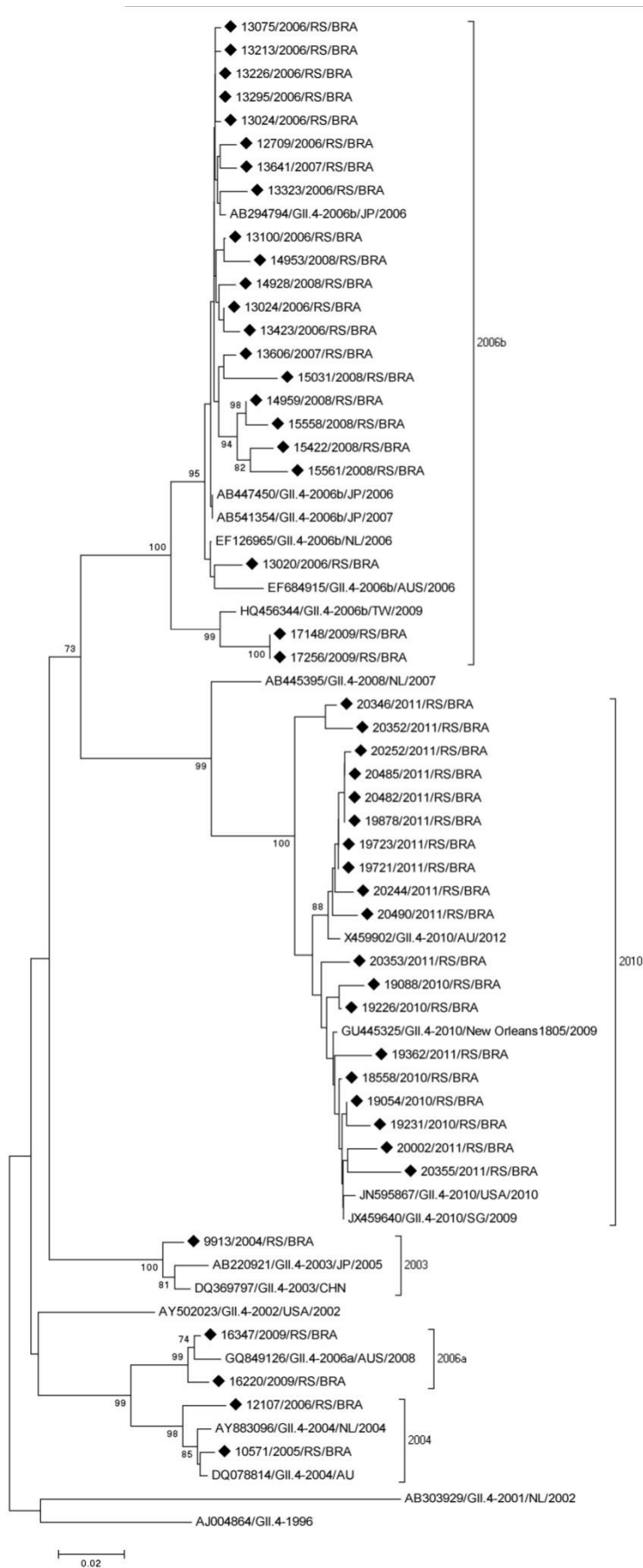


Figura 5.6: Árvore filogenética baseada na análise da região parcial (P2) do gene que codifica para a proteína VP1 de 46 amostras de norovírus pertencentes ao genogrupo II genótipo 4 (GII.4). Árvore filogenética baseada na sequencia nucleotídica parcial (633 pb) da região codificante do subdomínio P2 da proteína VP1 de norovírus GII.4, reconstruída a partir do método de *Neighbor-Joining* com o modelo de Kimura 2-parâmetros e réplicas de 2000 *bootstrap*. As amostras estudadas se encontram marcadas com um losango preto. Os valores de *bootstrap* estão indicados na árvore filogenética, valor menores que 70% não estão representados. A barra da parte inferior da figura é proporcional à distância genética

A caracterização das 46 amostras de GII.4 revelou a prevalência da variante 2006b detectada em 47,8% (22/46) das amostras, seguida das variantes 2010 em 41,3% (19/46), 2006a em 4,3% (2/46), 2004 em 4,3% (2/46) e 2003 em 2,2% (1/46). A Tabela 5.6 apresenta a distribuição destas variantes por ano e de acordo com a mesorregião, destacando a cocirculação de variantes no ano de 2006 (2004 e 2006b) e no ano de 2009 (2006a e 2006b). A mesorregião Metropolitana de Porto Alegre foi a que apresentou circulação de maior diversidade de variantes ao longo do período estudado (n=5). Também foi a mesorregião que concentrou o maior número de amostras caracterizadas (n=20), seguida da Noroeste Rio-Grandense (n=12), esta com três variantes. A variante 2006b, além de ser a mais frequente, foi a mais amplamente distribuída, sendo detectada em seis das sete mesorregiões do estado. Na mesorregião Nordeste Rio-Grandense, essa variante foi detectada quatro anos seguidos (2006-2009) (Tabela 5.6).

Tabela 5.6: Distribuição temporal e geográfica das variantes de norovírus GII.4 no período de 2004 a 2011 nas diferentes mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul.

Mesorregiões	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total
Centro Ocidental Rio-Grandense	-	-	2006b (1)	-	-	-	-	-	1
Oriental Rio-Grandense	-	-	2006b (2)	-	-	-	-	-	2
Metropolitana de Porto Alegre	2003 (1)	2004 (1)	2006b (3)	-	2006b (3)	2006a (1) 2006b (1)	2010 (3)	2010 (7)	20
Nordeste Rio-Grandense	-	-	2006b (1)	2006b (1)	2006b (1)	2006b (1)	2010 (1)	2010 (2)	7
Noroeste Rio-Grandense	-	-	2004 (1) 2006b (3)	2006b (1) -	2006b (3)	-	-	2010 (4)	12
Sudeste Rio-Grandense	-	-	2006b (1)	-	-	2006a (1)	2010 (1)	2010 (1)	4
Sudoeste Rio-Grandense	-	-	-	-	-	-	-	-	0

(n): número de amostras caracterizadas.

A análise global dos resultados obtidos permitiu a caracterização de 33% (108/327) dos surtos associados a NoV, sendo 73,1% (79/108) dos surtos genotipados associados ao GII.4. A Tabela 5.7 apresenta a distribuição temporal e geográfica destes surtos evidenciando as variantes de GII.4, mas também a detecção dos genótipos GI.1, GII.13 e GII.15, em três mesorregiões do estado.

Tabela 5.7: Distribuição temporal-geográfica e caracterização molecular dos surtos associados a norovirus no estado do Rio Grande do Grande do Sul no período de 2004 a 2011.

Mesorregiões	2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011	
	Nº surtos	Genótipos	Nº surtos	Genótipos	Nº surtos	Genótipos	Nº surtos	Genótipos	Nº surtos	Genótipos	Nº surtos	Genótipos	Nº surtos	Genótipos	Nº surtos	Genótipos
Centro Occidental Rio- Grandense	0	0	0	0	3	GII.4/2006b(1)	1	0	1	GII.6(1)	0	0	0	0	0	0
Oriental Rio- Grandense	1	GII.4(1)	2	0	2	GII.4/2006b(2)	0	0	3	GII.6(1) GI.3(1)	0	0	0	0	0	0
Metropolitana de Porto Alegre	4	GII.4/2003(1) GII.14(1)	10	GII.4(1) GII.4/2004(1)	28	GII.4 (3) GII.4/2006b(3) GII.17(1)	15	GII.21(1) GI.1(1) GII.4(1)	23	GII.4(1) GII.4/2006b(3) GII.6(2) GII.3(1)	20	GII.4 (4) GII.4/2006a(1) GII.4/2006b(1)	27	GII.4(1) GII.4/2010(3) GII.3(2) GII.6(1)	16	GII.4(2) GII.4/2010(5) GII.3(2) GII.15(1)
Nordeste Rio- Grandense	2	GII.6(1)	6	GII.17(1)	19	GII.4(4) GII.4/2006b(1)	9	GII.4 (1) GII.4/2006b(1)	10	GII.4(1) GII.4/2006b(1) GII.6(1) GII.21(1)	2	GII.4/2006b(1) GII.12(1)	4	GII.4/2010(1) GII.13(1)	3	GII.4/2010(2) GII.3(1)
Noroeste Rio- Grandense	1	0	9	GII.17(1)	48	GII.4(9) GII.4/2004(1) GII.4/2006b(3)	12	GII.2(1) GII.4/2006b(1) GII.6(1)	14	GII.4 (2) GII.4/2006b(3)	1	0	9	GII.4(2) GII.6(1) GII.15(1)	7	GII.4/2010(4)
Sudeste Rio- Grandense	0	0	0	0	9	GII.4(2) GII.4/2006b(1)	0	0	2	GII.6 (1)	2	GII.4/2006a(1) GII.12(1)	1	GII.4/2010(1)	1	GII.4/2010(1)
Sudoeste Rio- Grandense	1	GII.6 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	9	3	27	2	109	2	37	5	53	5	25	2	40	5	27	3

(n): número de surtos genotipados

6-Discussão

Em todo o mundo os NoV têm sido apontados como os principais agentes envolvidos em casos de surto de GA (Patel et al., 2009). A associação de 44% dos surtos de GA analisados nesse estudo aos NoV enfatiza o impacto destes vírus no estado do RS. Este alto percentual corrobora dados provenientes da Europa e Estados Unidos onde aproximadamente 50% destes surtos são causados por NoV (Patel et al., 2009).

A taxa de detecção de NoV de 36,1% é superior a obtida em alguns estudos realizados no Brasil, onde a positividade variou de 8,6% a 20% (Borges et al., 2006; Victoria et al., 2007; Andreasi et al., 2008; Nakagomi et al., 2008; Ferreira et al., 2010b). Entretanto, outros estudos demonstraram taxas similares ou superiores variando de 35% a 66% (Castilho et al., 2006; Soares et al., 2007; Campos et al., 2008; Ribeiro et al., 2008; Ferreira et al., 2010a). Particularmente, na região sul do país a literatura relata apenas um estudo realizado em Porto Alegre com taxa de 13,2% (Georgiadis et al., 2010). Vale ressaltar, que o percentual de detecção obtido neste estudo está associado a população do estudo que inclui somente amostras provenientes de surtos.

A análise da distribuição mensal ao longo dos oito anos de estudo evidenciou uma sazonalidade das infecções por NoV nos meses de primavera e inverno. Estes dados são semelhantes aos observados em estudos que apontam uma maior ocorrência de infecções por NoV em meses mais frios (Fankhauser et al., 1998; Mounts et al., 2000; Green et al., 2002), embora ainda seja discutível o padrão de sazonalidade para este vírus (Lopman et al., 2003; Marshall et al., 2003; Parashar et al., 2004; Andreasi et al., 2008; Soares et al., 2007). Vale ressaltar, que Georgiadis e colaboradores (2010) na cidade de Porto Alegre verificaram um pico de detecção na primavera. Picos de detecção em meses de baixa umidade foram descritos por outros autores brasileiros

(Victoria et al, 2007; Ferreira et al., 2010a, 2010b), entretanto já foi descrito pico de detecção em período de alta umidade (Borges et al., 2006).

A relação NoV e grupo etário demonstrou uma tendência estatisticamente significativa no aumento da taxa de detecção e maior idade das pessoas estudadas com o aumento do grupo etário, o que pode ser decorrente da população estudada. Esta investigação foi conduzida utilizando amostras previamente negativas para RV-A, e provavelmente, o perfil etiológico das GA em crianças é mais diverso, incluindo uma taxa maior de infecção por outros agentes virais, como astrovirus, adenovirus, assim como de vírus emergentes como HBoV e Aichi, além de etiologias parasitárias e bacterianas. Isto poderia explicar a menor taxa de detecção de NoV em faixas etárias inferiores, quando comparadas a adultos (Cardoso et al., 2002; Victoria et al., 2007; Carvalho-Costa et al., 2011; Bicer et al., 2011; Verma et al., 2011; Cashman & O'Shea, 2012; Sousa et al., 2012). Os NoV acometem pessoas de todas as idades (Rockx et al., 2002; Borges et al., 2006; Ferreira et al., 2008, 2010a; Patel et al., 2009), embora alguns estudos demonstrem taxas de infecção maiores entre crianças, sendo apontado como o segundo principal agente viral causador de gastroenterites em crianças depois dos RV-A (Tompkins et al., 1999; Pang et al., 2000; de Wit et al., 2001).

Em relação às manifestações clínicas não foi possível realizar a análise de todos os anos do período de estudo, pois a partir do ano de 2006 a ficha epidemiológica foi substituída por outro modelo e passou a ser preenchida de forma incompleta. Por esse motivo a análise ficou detida ao período de 2004 a 2006, sendo possível verificar que o vômito foi significativamente mais frequente em indivíduos infectados por NoV, sendo observado em todos os grupos etários. Em contrapartida, a dor abdominal foi mais frequente em crianças de 1 a 10 anos de idade. Pesquisas anteriores revelam que estas são as principais manifestações clínicas observadas em pacientes com infecção por NoV

(Kaplan et al., 1982; Hedberg & Osterholm, 1993; Becker et al., 2000; Rockx et al., 2002; Lopman et al., 2004; Patel et al., 2009; Arias et al., 2010). Rockx e colaboradores (2002) descreveram vômito em maior frequência em adultos, embora alguns autores tenham observado maior frequência em crianças e adolescentes (Kaplan et al., 1982; Hedberg & Osterholm, 1993; Thornton et al., 2004; Arias et al., 2010; Ferreira et al., 2010a). Sintomas como dores abdominais podem ser difíceis de detectar em crianças menores de um ano de idade, o que pode explicar menor frequência nesse grupo etário.

A análise estatística demonstrou que diarreia sanguinolenta ou com muco e tosse não estão associados à infecção por NoV corroborando estudos anteriores. (Hedberg & Osterholm, 1993; Rockx et al., 2002; Lopman et al., 2004), estando provavelmente associado a outras etiologias.

6.1- Caracterização molecular

A análise dos dados evidenciou a grande diversidade de NoV circulando em diferentes mesorregiões do estado, compreendendo principalmente genótipos do GII (10 genótipos caracterizados) e apenas dois do GI. A baixa frequência de GI detectada corrobora estudos anteriores que também observaram baixa frequência desse genogruppo (Castilho et al., 2006; Victoria et al., 2007; Barreira et al., 2010; Ferreira et al., 2010a, 2012a; Fioretti et al., 2011), embora outros tenham demonstrado maior envolvimento deste em surtos quando comparado ao GII (Chapman et al., 2011; Arvelo et al., 2012; Nenonen et al., 2012). A detecção do GI.1 representa a primeira descrição deste genótipo no Brasil, que tem sido associado a surtos e casos esporádicos em diferentes países, tais como: Korea (Park et al., 2012), Croácia (Ljubin-Sternak et al., 2007),

Hiroshima (Fukuda et al., 2008), Madagascar (Papaventsis et al., 2007), Índia (Nayak et al., 2009), Japão (Phan et al., 2006) e Itália (Ramirez et al., 2009). O genótipo GI.3 foi descrito anteriormente no Brasil nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Castilho et al., 2006; Ferreira et al., 2010a, 2012a; Fioretti et al., 2011).

Em relação ao GII, ficou evidente o impacto da circulação do GII.4 no estado do Rio Grande do Sul, com sua detecção em todos os anos do período estudado e em seis das sete mesorregiões do estado. Outros estudos brasileiros evidenciaram a prevalência desse genótipo em diversos estados, em indivíduos hospitalizados e não hospitalizados de diversas faixas etárias (Castilho et al., 2006; Victoria et al., 2007; Campos et al., 2008; Barreira et al., 2010; Ferreira et al., 2010b, 2012b; Fioretti et al., 2011) e em surtos (Gallimore et al., 2004; Ferreira et al., 2010a, 2012a). O impacto do GII.4 nas infecções por NoV tem sido descrito, estando associado a maior parte dos surtos ocorridos pelo mundo desde meados de 1990 (Siebenga et al., 2007b, 2009; Reuter et al., 2008; Patel et al., 2009; Pang et al., 2010; Zheng et al., 2010; CDC, 2011; Marshall et al., 2011; Jeong et al., 2012; Lai et al., 2012).

Surtos decorrentes de outros genótipos de GII também são frequentes em todo mundo. Neste estudo, o GII.6 foi o segundo prevalente, corroborando dados de sua prevalência no país (Castilho et al., 2006; Barreira et al., 2010; Fioretti et al., 2011; Ferreira et al., 2010a). No Japão esse genótipo também foi o segundo prevalente em crianças não hospitalizadas com GA e associado ao surgimento de uma nova variante (Chan-It et al., 2012). Estudos na Índia, China, Finlândia e Escócia demonstram a circulação frequente desse genótipo (Chhabra et al., 2009; Nataraju et al., 2011; Puustinen et al., 2011; McAllister et al., 2012; Zeng et al., 2012).

Os GII.2, GII.3 e GII.14, encontrados em baixa frequência nesse estudo foram detectados em estudos prévios realizados no Brasil e em outros países (Borges et al.,

2006; Victoria et al., 2007; Barreira et al., 2010; Fioretti et al., 2011; Mathijs et al., 2011; Räsänen et al., 2011; Fernández et al., 2012; Gómez-Santiago et al., 2012; Yassin et al., 2012; Zeng et al., 2011 e 2012). No Japão, o GII.2 se destacou por ser o prevalente em casos de surtos entre os anos de 2009 e 2010 (Iritani et al., 2012). O GII.3 foi detectado no país nos estados da Bahia (Borges et al., 2006), Espírito Santo (Barreira et al., 2010) e Rio de Janeiro (Gallimore et al., 2004). Na Etiópia, foi observado em maior frequência quando comparado a outros genótipos em casos de GA (Yassin et al., 2012), Recombinantes de GII.3 (GII.3/GII.b) foram detectados em crianças hospitalizadas na Austrália (Mahar & Kirkwood, 2011). O GII.14 também foi detectado no Espírito Santo (Barreira et al., 2010) e em baixa frequência na China, Japão e Índia (Chhabra et al., 2009; Chan-It et al., 2011; Zeng et al., 2011 e 2012). Recombinantes de GII.6/GII.14 e GII.8/GII.14 foram descritos na Korea (Han et al., 2011) e Gana (Armah et al., 2006), respectivamente.

A detecção do GII.21 no RS representou a segunda descrição deste genótipo no país, sendo a primeira no estado do Rio de Janeiro (Ferreira et al., 2012b). Este genótipo foi descrito inicialmente como uma possível recombinação entre GII.b e GII.18 (Chhabra et al., 2010). Atualmente, é representado com amostras de referência do Iraque (AY675554) e Índia (EU019230), na ferramenta on line *Norovirus Genotyping Toll Version 1.0* (Kroneman et al., 2011). Um estudo recente demonstra a detecção desse genótipo em amostras ambientais de um rio na Espanha (Pérez-Sautu et al., 2012).

Os GII.12 e GII.17 também foram descritos no Brasil recentemente (Fioretti et al., 2011; Ferreira et al. 2012). Poucos estudos descrevem o genótipo GII.12 em outros países, com relatos no Japão (Fukuda et al., 2010), Estados Unidos (Vega & Vinjé, 2011b) e Guatemala (Arvelo et al., 2012). Este genótipo foi encontrado com maior frequência que GII.4 em crianças hospitalizadas no Vietnam (Tamura et al., 2010) e em

crianças na Finlândia (Puustinen et al., 2011). Nos Estados Unidos, um recombinante GII.g/GII.12 foi detectado em um surto ocorrido no ano de 2010 (Takanashi et al., 2011). O GII.17 também foi detectado na Korea do Sul, Argentina, Tailândia, Guatemala, Camarões, China, Argentina e Nicarágua (Bucardo et al., 2008; Gomes et al., 2008; Chung et al., 2010; Jin et al., 2010; Kittigul et al., 2010; Ayukekbong et al., 2011; Arvelo et al., 2012).

Os GII.13 e GII.15 detectados neste estudo representam a primeira descrição destes genótipos na América Latina. O GII.13, com poucos relatos na literatura, tem sido associado a surtos na Escócia, Bélgica e Austrália (Bruggink & Marshall, 2009; Mathijs et al., 2011; McAllister et al., 2012). Também foi descrito em crianças hospitalizadas no Vietnã e China (Trang et al., 2012; Zeng et al., 2012). Em um estudo conduzido na Índia, Chhabra e colaboradores (2010) descreveram o recombinante GII.3/GII.13. O GII.15 foi descrito em surtos ocorridos no Japão, Turquia e China (Iritani et al., 2010; Jin et al., 2011; Ahmed et al., 2012).

Na última década estudos realizados em outros estados brasileiros demonstraram a grande diversidade genética dos NoV relatando a circulação dos NoV GI e GII (Castilho et al., 2006; Fioretti et al., 2011; Ferreira et al., 2012a). Na América Latina, em países próximos ao estado do RS, esta diversidade também tem sido relatada, assim como a descrição do GIV e de recombinantes (Martínez et al., 2002, Gomes et al., 2007, 2008; Galeano et al., dados não publicados). A detecção na América Latina de diferentes genótipos de NoV demonstra a importância da vigilância ativa destes vírus em casos de gastroenterite aguda, incluindo sua análise molecular.

6.1.1-Variantes de norovirus GII.4

A associação de cinco variantes de GII.4 aos surtos ocorridos no estado do Rio Grande do Sul no período estudado (8 anos) corrobora o impacto epidemiológico da introdução de novas variantes uma região geográfica (Bull & White, 2011; Siebenga et al., 2007a, 2009).

A variante GII.4/2003 e GII.4/2004, detectadas nos anos de 2004 e 2005 respectivamente, demonstraram um padrão de circulação semelhante ao que foi observado na Nova Zelândia (Greening et al., 2012), no Japão (Motomura et al., 2010) e Austrália (Bruggink & Marshall, 2010), embora tenham sido detectadas em baixa frequência. Entretanto, as variantes de GII.4, caracterizadas no ano de 2006 (variantes 2006a e b), representaram 37% de todas as GII.4. As variantes GII.4 2006a/b foram apontadas, em diversos estudos, como causadora de vários surtos ao redor do mundo e, atualmente são reconhecidas como variantes pandêmicas (Bull et al., 2006; Tu et al., 2008; Siebenga et al., 2009; Eden et al., 2010; Marshall et al., 2011).

Neste estudo, a variante 2006b foi a prevalente, sendo detectada ao longo dos anos (2006 a 2009) e, também, a mais amplamente distribuída entre as mesorregiões do estado. A 2006a foi detectada somente em 2009 em uma mesorregião. Alguns estudos relatam a variante 2006a como predominante em alguns países durante o período de 2005-2006, sendo substituída em seguida pela variante 2006b no período de 2006-2007, permanecendo em circulação até o período de 2008-2009 (Kroneman et al., 2006; Tu et al., 2008; Kamel et al., 2009; Motomura et al., 2010; Tran et al., 2012). Em todo o mundo, ao longo dos anos, enquanto a prevalência da variante 2006a decrescia, a variante 2006b permanecia circulando em alta frequência (Siebenga et al., 2009).

No ano de 2010 e 2011 a variante GII.4/2010 foi dominante, detectada em três das sete mesorregiões do estado do RS. Nos EUA, essa variante foi detectada pela primeira vez no inverno de 2009-2010, envolvida um grande número de surtos causados por GII.4 no ano de 2010, embora não tenha sido relacionada com o aumento do número de surtos. Em dezembro de 2009 a variante 2006b, até então dominante, já havia sido substituída pela variante 2010, que foi responsável por 75% dos surtos de NoV nos EUA (Vega et al., 2011a, Yen et al., 2010). Na Bélgica foi demonstrada a substituição da variante 2006b pela variante 2010 a partir de dezembro de 2009, assim como ocorreu nos EUA (Mathijs et al., 2011).

A substituição de variantes de GII.4, observada nas infecções por NoV, expõe a população susceptível a um vírus ao qual não possui imunidade, explicando o envolvimento frequente deste genótipo em surtos de GA e sua alta prevalência em todo o mundo (Bull et al., 2006; Tu et al., 2008; Marshall et al., 2011).

A grande diversidade de NoV, assim como o surgimento a intervalos regulares de novas variantes de GII.4 associadas a surtos foi demonstrada neste estudo enfatizando a necessidade de se manter uma vigilância epidemiológica molecular desses vírus no estado e no país. Estes resultados alertam também para a importância de se estabelecer uma rede de vigilância que integre os diferentes estados e países vizinhos, e auxilie nas medidas de prevenção de surtos. Dados de diversidade genética e distribuição viral também são fundamentais para o desenvolvimento de uma vacina eficaz

7-Conclusões

- A frequência de infecções (36%) e a associação dos NoV a 44% dos surtos estudados demonstram o impacto destes vírus nos casos de GA estado do RS.
- A alta frequência de infecções por NoV (36%) está relacionada a população de estudo (casos provenientes de surtos e com diagnóstico negativo para RV-A).
- O aumento da frequência de infecção por NoV foi relacionado ao aumento do grupo etário.
- A sazonalidade das infecções por NoV foi associada às estações de primavera e inverno.
- As manifestações clínicas mais frequentes nas infecções por NoV são vômito e dores abdominais. Diarréia com sangue e muco não está relacionada à infecção por NoV.
- A diversidade de genótipos de NoV no estado foi evidenciada pela detecção de dois genótipos pertencentes ao GI e 10 ao GII.
- Este foi o primeiro estudo a detectar GI.1, GII.13 e GII.15 no Brasil.
- O genótipo GII.4 foi o prevalente, com distribuição geográfica ampla, detectado em seis das sete mesorregiões do RS e em todos os anos do período estudado.
- A caracterização de variantes de NoV GII.4 demonstrou a circulação de cinco variantes distintas durante o período estudado: 2003, 2004, 2006a, 2006b e 2010.

- A variante GII.4/2006b foi detectada mais frequentemente quando comparada às outras variantes, estando associada a um grande número de surtos até 2010, quando a variante GII.4/2010 foi introduzida.
- O grande número de genótipos e variantes de GII.4 demonstrou a diversidade dos NoV associados a surtos de GA, revelando a importância de se estabelecer uma vigilância epidemiológica e molecular ativa destes vírus no estado e no país como um todo.

8-Perspectivas

Realizar o estudo de evolução e avaliar a dispersão populacional dos NoV circulantes no estado do RS no período de 2004 a 2011.

9-Referências Bibliográficas

Adamson WE, Gunson RN, Maclean A, Carman WF. Emergence of a new norovirus variant in Scotland in 2006. *J Clin Microbiol* 2007;45(12):4058-4060.

Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 1969;119(6):668-73.

Ahmed SF, Klena JD, Mostafa M, Dogantemur J, Middleton T, Hanson J, Sebeny PJ. Viral gastroenteritis associated with genogroup II norovirus among U.S. military personnel in Turkey, 2009. *PLoS One* 2012;7(5):e35791.

Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Hansman G, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. *Arch Virol* 2005; 150(10):2061-75.

Amar CF, East CL, Gray J, Iturriza-Gomara M, Maclure EA, McLauchlin J. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26(5): 311-23.

Ando T, Mulders N, Lewis DC, Estes MK, Monroe SS, Glass RI. Comparison of the polymerase region of small round structured virus strain previously characterized in three serotypes by solid phase immune microscopy. *Arch Virol* 1994; 135(1-2):217-26.

Ando T, Jin Q, Gentsch JR, Monroe SS, Noel JS, Dowell SF, Cicirello HG, Kohn MA, Glass RI. Epidemiologic applications of novel molecular methods to detect and differentiate small round structured viruses (Norwalk-like viruses). *J Med Virol* 1995; 47(2):145-52.

Andreasi MS, Cardoso DD, Fernandes SM, Tozzetti IA, Borges AM, Fiaccadori FS, Santos RA, Souza M. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(7):741-44.

Arias C, Sala MR, Domínguez A, Torner N, Ruíz L, Martínez A, Bartolomé R, de Simón M, Buesa J. Epidemiological and clinical features of norovirus gastroenteritis in outbreaks: a population-based study. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(1):39-44.

Armah GE, Gallimore CI, Binka FN, Asmah RH, Green J, Ugoji U, Anto F, Brown DW, Gray JJ. Characterisation of norovirus strains in rural Ghanaian children with acute diarrhoea. *J Med Virol* 2006;78(11):1480-85.

Arvelo W, Sosa SM, Juliao P, López MR, Estevéz A, López B, Morales-Betoulle ME, González M, Gregoricus NA, Hall AJ, Vinje J, Parashar U, Lindblade KA. Norovirus outbreak of probable waterborne transmission with high attack rate in a Guatemalan resort. *J Clin Virol* 2012;55(1):8-11.

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(1):15-37.

Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, Graham DY. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(10):1553-57.

Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, Al-Ibrahim MS, Chen WH, Ferreira J, Estes MK, Graham DY, Opekun AR, Richardson C, Mendelman PM. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness. *N Engl J Med* 2011; 365(23): 2178–2187.

Atmar RL, Estes MK. Norovirus vaccine development: next steps. *Expert Rev Vaccines* 2012;11(9):1023-25.

Ayukekbong J, Lindh M, Nenonen N, Tah F, Nkuo-Akenji T, Bergström T. Enteric viruses in healthy children in Cameroon: viral load and genotyping of norovirus strains. *J Med Virol* 2011;83(12):2135-42.

Badger GF, Curtiss C, Dingle JH, Hodges RG, Jordan WS, McClorke LP. A study of illness in a group of Cleveland families: XI. The occurrence of gastrointestinal symptoms. *Am J Hyg* 1956; 64(3):348-56.

Ball JM, Graham DY, Opekun AR, Gilger MA, Guerrero RA, Estes MK. Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterology* 1999;117(1):40-8.

Bereciartu A, Bok K, Gómez J. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Virol* 2002; 25(2):197-203.

Barreira DM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadvovsky AD, Leite JP, Miagostovich MP, Spano LC. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J Clin Virol* 2010; 47(1):60-4.

Becker KM, Moe CL, Southwick KL, Mac Cormack JN. Transmission of Norwalk virus during football game. *N Engl J Med* 2000;343(17):1223-27.

Bennett S, Maclean A, Miller R, Aitken C, Gunson R. Increased norovirus activity in Scotland in 2012 is associated with the emergence of a new norovirus GII.4 variant. *Euro Surveill* 2013;18(2).

Bertolotti-ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. 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* 2003; 77(21):11603–15.

Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Lüthi TM. Norwalk-like viruses sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(4): 1925-31.

Bicer S, Sahin GT, Koncay B, Gemici H, Siraneci R, Ozturk NY, Sevketoglu E. Incidence assessment of rotavirus and adenovirus associated acute gastroenteritis cases in early childhood. *Infez Med* 2011;19(2):113-19.

Black DN, Burroughs JN, Harris TJR, Brown F. The structure and replication of calicivirus RNA. *Nature* 1978; 274(5671): 624-25.

Blacklow NR, Dolin R, Fedson DS, Dupont H, Northrup RS, Hornick RB, Chanock RM. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: etiology and pathogenesis. *Ann Intern Med* 1972;76(6): 993–1008.

Blaney DD, Daly ER, Kirkland KB, Tongren JE, Kelso PT, Talbot EA. Use of alcohol-based hand sanitizers as a risk factor for norovirus outbreaks in long-term care facilities in northern New England: December 2006 to March 2007. *Am J Infect Control* 2011; 39(4):296-301.

Boon D, Mahar JE, Abente JE, Kirkwood CD, Purcell RH, Kapikian AZ, Grenn KY, Bok K. Comparative Evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period. *J Virol* 2011; 85(17): 8656-66.

Bok K, Abente EJ, Realpe-Quintero M, Mitra T, Sosnovtsev SV, Kapikian AZ, Green KY. Evolutionary Dynamics of GII.4 Noroviruses over a Thirty-four Year Period. *J Virol* 2009;83(22): 11890–901.

Borges AM, Teixeira JM, Costa PS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco Rde C, Brito WM, Leite JP, Cardoso Dd. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(7):721-24.

Brinker JP, Blacklow NR, Jiang X, Estes MK, Moe CL, Herrmann JE. Immunoglobulin M antibody test to detect genogroup II Norwalk-like virus Infection. *J Clin Microbiol* 1999; 37(9):2983–86.

Bruggink LD, Marshall JA. Molecular and epidemiological features of GIIB norovirus outbreaks in Victoria, Australia, 2002-2005. *J Med Virol* 2009;81(9):1652-60.

Bruggink LD, Marshall JA. Molecular changes associated with altered patterns of norovirus outbreak epidemics in Victoria, Australia, in 2006 to 2007. *J Clin Microbiol* 2010;48(3):857-61.

Bruin ED, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods* 2006; 137(2): 259-64.

Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, Paniagua M, Lindgren PE, Espinoza F, Svensson L. Pediatric norovirus diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol* 2008; 46(8):2573–80.

Bucardo F, Lindgren P-E, Svensson L, Nordgren J. Low Prevalence of Rotavirus and High Prevalence of Norovirus in Hospital and Community Wastewater after Introduction of Rotavirus Vaccine in Nicaragua. *PLoS ONE* 2011; 6(10): e25962.

Buesa J, Collado B, Lopez-Andujar P, Abu-Mallouh R, Rodriguez Diaz J, Garcia Diaz A, Prat J, Guix S, Llovet T, Prats G, Bosch A. Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J Clin Microbiol* 2002; 40(8):2854-59.

Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2006;44(2):327-33.

Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, White PA. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog* 2010; 6(3):e1000831.

Bull RA, White PA. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends Microbiol* 2011;19(5):233-40.

Bull RA, Eden JS, Luciani F, McElroy K, Rawlinson WD, White PA. Contribution of intra and interhost dynamics to norovirus evolution. *J Virol* 2012; 86(6):3219-29.

Burroughs JN, Brown F. Presence of a covalently linked protein on caliciviral RNA. *J Gen Virol* 1978; 41(2): 443-6.

Campos GS, Moreau VH, Bandeira A, Barberino G, Almeida PF, Amador DM, Lima MO, Sardi S. Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. *Arch Virol* 2008; 153(6): 1125-29.

Cannon RO, Poliner JR, Hirschhorn RB, Rodeheaver DC, Silverman PR, Brown EA, Talbot GH, Stine SE, Monroe SS, Dennis DT. A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with consumption of commercial ice. *J Infect Dis* 1991; 164(5):860-63

Cannon JL, Lindesmith LC, Donaldson EF, Saxe L, Baric RS, Vinjé J. Herd immunity to GII.4 noroviruses is supported by outbreak patient sera. *J Virol* 2009; 83(11): 5363-74.

Cardoso DDP, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Martins RMB, Gagliardi Leite JPG. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiânia, Goiás, Brazil. *Med Sci Monit* 2002;8(9):CR624-8.

Carvalho-Costa FA, Volotão Ede M, de Assis RM, Fialho AM, de Andrade Jda S, Rocha LN, Tort LF, da Silva MF, Gómez MM, de Souza PM, Leite JP. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30(1):S35-41.

Cashman O, O'Shea H. Detection of human bocaviruses 1, 2 and 3 in Irish children presenting with gastroenteritis. *Arch Virol* 2012;157(9):1767-73.

Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinjé J, RácZ ML. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo State, Brazil. *J Clin Microbiol* 2006; 44(11):3947-53.

Castriciano S, Luinstra K, Petrich A, Smieja M, Lee C , Jang D, Portillo E, Chernesky M. Comparison of the RIDASCREEN norovirus immunoassay to IDEA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy. *J Virol Methods* 2007; 141 (2): 216-19.

Caul EO. Viral Gastroenteritis: small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet* 1994; 343(8980):1240-42

Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus activity-United States, 2006–2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007;56:842–46.

Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus outbreak in an elementary school--District of Columbia, February 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008;56(51-52):1340-3.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Norovirus outbreaks on three college campuses - California, Michigan, and Wisconsin, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58(39):1095-100.

Centers for Disease Control and Prevention. Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Recomm Rep* 2011;60(RR-3):1-18.

Chan-It W, Thongprachum A, Okitsu S, Nishimura S, Kikuta H, Baba T, Yamamoto A, Sugita K, Hashira S, Tajima T, Mizuguchi M, Ushijima H. Detection and genetic characterization of norovirus infections in children with acute gastroenteritis in Japan, 2007-2009. *Clin Lab* 2011;57(3-4):213-20.

Chan-It W, Thongprachum A, Khamrin P, Kobayashi M, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Emergence of a new norovirus GII.6 variant in Japan, 2008-2009. *J Med Virol* 2012; 84(7):1089-96.

Chang KO, George DW. Interferons and ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replicon-bearing cells. *J Virol* 2007; 81(22):12111-18

Chapman AS, Witkop CT, Escobar JD, Schlorman CA, DeMarcus LS, Marmer LM, Crum ME. Norovirus outbreak associated with person-to-person transmission, U.S. Air Force Academy, July 2011. *MSMR* 2011; 18(11):2-5.

Charles KJ, Shore J, Sellwood J, Laverick M, Hart A, Pedley S. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. *J Appl Microbiol* 2009; 106(6):1827-37.

Cheesbrough JS, Barkess-Jones L, Brown DW. Possible prolonged environmental survival of small round structured viruses. *J Hosp Infect* 1997; 35(4):325-26.

Cheetham S, Souza M, Meulia T, Grimes S, Han MG, Saif LJ. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol* 2006; 80(21):10372-81.

Chhabra RA, Dhongade RK, Kalrao VR, Bavdekar AR, Chitambar SD. Epidemiological, clinical and molecular features of norovirus infections in western India. *J Med Virol* 2009; 82(5):156-52.

Chhabra P, Walimbe AM, Chitambar SD. Molecular characterization of three novel intergenotype norovirus GII recombinant strains from western India. *Virus Res* 2010;147(2):242-46.

Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T, Fukui S. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol* 1979; 4(4):249-54.

Chung JY, Han TH, Park SH, Kim SW, Hwang ES. Detection of GII-4/2006b variant and recombinant noroviruses in children with acute gastroenteritis, South Korea. *J Med Virol* 2010; 82(1):146-52.

Clarke IN, Estes MK, Green KY, Hansman GS, Knowles NJ, Koopmans MK, Matson DO, Meyers G, Neill JD, Radford A, Smith AW, Studdert MJ, Thiel HJ, Vinjé, J. Caliciviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King, A.M.Q., Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ pp 977-986. San Diego: Elsevier 2011.

Clay S, Maherchandani S, Malik YS, Goyal SM. Survival on uncommon fomites of feline calicivirus, a surrogate of noroviruses. *Am J Infect Control* 2006; 34(1):41-43.

Cubitti WD, McSwiggan DA, Moore W. Winter vomiting disease caused by calicivirus. *J Clin Patol* 1979; 32(8): 786-93.

Daniels NA, Bergmire-Sweat DA, Schwab KJ, Hendricks KA, Reddy S, Rowe SM, Fankhauser RL, Monroe SS, Atmar RL, Glass RI, Mead P. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *J Infect Dis* 2000; 181(4): 1467-70.

Dastjerdi AM, Green J, Gallimore CI, Brown DW, Bridger JC. The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology* 1999; 254(1): 1-5.

De Leon R, Matsui SM, Baric RS, Herrman JE, Blacklow NR, Greenberg HB, Sobsey MD. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J Clin Microbiol* 1992; 30(12):3151-57.

de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Wannet WJ, Vinjé J, van Leusden F, Bartelds AI, van Duynhoven YT. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001;154(7):666-74.

Dean AG, Arner TG, Sunki GG, Friedman R, Lantinga M, Sangam S, Zubieta JC, Sullivan KM, Brendel KA, Gao Z, Fontaine N, Shu M, Fuller G, Smith DC, Nitschke DA, and Fagan RF. *Epi Info™*, a database and statistics program for public health professionals. CDC, Atlanta, GA, USA, 2011.

Dingle JH, McCorkle LP, Badger GF, Curtiss C, Hodges RG, Jordan WS. A study of illness in a group of Cleveland families:XXXI. Clinical description of acute nonbacterial gastroenteritis. *Am J Hyg* 1956; 64:368-75.

Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Formal S, Buscho RF, Kasel JA, Chames RP, Hornick R, Chanock RM. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis* 1971; 123(3): 307-12.

Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA, Hornick R, Chanock RM. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972; 140(2): 184-89.

Doménech-Sánchez A, Juan C, Pérez JL, Berrocal I. Unmanageable norovirus outbreak in a single resort located in the Dominican Republic. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(6):952-54.

Donaldson, E.F.; Lindesmith, L.C.; Lobue, A.D.; Baric, R.S. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev* 2008;225: 190–211.

Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Viral shapeshifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:231–41.

Doultree JC, Druce JD, Birch CJ, Bowden DS, Marshall JA. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J Hosp Infect* 1999;41:51–7.

Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(8):4538–43.

Duizer E, Kroneman A, Siebenga J, Verhoef L, Vennema H, Koopmans M, the FBVE network. Typing database for noroviruses. *Eurosurveillance* 2008;13(19).

Eden JS, Bull RA, Tu E, McIver CJ, Lyon MJ, Marshall JA, Smith DW, Musto J, Rawlinson WD, White PA. Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007-2008. *J Clin Virol* 2010; 49(4): 265–71.

Eden JS, Lim KL, White PA. Complete genome of the human norovirus GIV.1 strain Lake Macquarie virus. *J Virol* 2012; 86(18):10251-52.

El-Kamary SS, Pasetti MF, Mendelman PM, Frey SE, Bernstein DI, Treanor JJ, Ferreira J, Chen WH, Sublett R, Richardson C, Bargatze RF, Sztein MB, Tacket CO. 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* 2010;202(11):1649-58.

Eleraky NZ, Potgieter LN, Kennedy MA. Virucidal efficacy of four new disinfectants. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002;38(3):231–34.

EPA, Environmental Protection Agency. 2012. [Capturado dezembro 2012] Disponível em: http://www.epa.gov/oppad001/list_g_norovirus.pdf.

Estes MK, Ball JM, Guerrero RA, Opekun AR, Gilger MA, Pacheco SS, Graham DY. Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis* 2000;181 (2):S367-73.

Estes MK, Prasad BV, Atmar RL. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19(5):467-74.

Etherington GJ, Dicks J, Roberts IN. High throughput sequence analysis reveals hitherto unreported recombination in the genus *Norovirus*. *Virology* 2006;345(1):88–95.

Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T Glass, RI. Molecular epidemiology of “Norwalk-like viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 1998; 178(6): 1571-78.

Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, Ando T, Glass RI. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 2002; 186(1):1–7.

FEE, Fundação de Economia e Estatística. [Capturado dezembro 2012]. Disponível em <http://mapasdev.fee.tche.br/mesorregioes-e-microrregioes-geograficas-ibge-rio-grande-do-sul-2009.html>.

Fernández MD, Torres C, Poma HR, Riviello-López G, Martínez LC, Cisterna DM, Rajal VB, Nates SV, Mbayed VA. Environmental surveillance of norovirus in Argentina revealed distinct viral diversity patterns, seasonality and spatio-temporal diffusion processes. *Sci Total Environ* 2012;437:262-69.

Ferreira MS, Xavier MP, Fumian TM, Victoria M, Oliveira SA, Pena LH, Leite JP, Miagostovich MP. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. *J Med Virol* 2008; 80(2):338-44.

Ferreira MS, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MP, Fioretti JM, Andrade J, Volotão EM, Rocha M, Leite JP, Miagostovich MP. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio De Janeiro, Brazil 2005-2008. *J Med Virol* 2010a; 82(8):1442-48.

Ferreira RG, Borges AMT, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Santos RAT, Cardoso DDP. Gastroenteric virus detection in fecal samples from woman in Goiânia, State of Goiás, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010b; 43(3): 240-43.

Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM, de Assis RM, Carvalho Costa FA, de Oliveira SA, Leite JP, Miagostovich MP. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *PLoS One* 2012a; 7(3):e33754.

Ferreira MS, Garcia RCC, Xavier MPTP, Ribeiro RL, Assis RM, Mota MCMS, Leite JPG, Miagostovich MP, Oliveira AS. Genotyping of gastroenteric viroses in hospitalized children: first report of norovirus GII.21 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012b; 107(8):1064-1067.

Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, Vieira CB, Xavier Mda P, Leite JP, Miagostovich MP. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(8):942-47.

Frange P, Touzot F, Debré M, Héritier S, Leruez-Ville M, Cros G, Rouzioux C, Blanche S, Fischer A, Avettand-Fenoël V. Prevalence and clinical impact of norovirus fecal shedding in children with inherited immune deficiencies. *J Infect Dis* 2012; 206(8):1269-74.

Fretz R. How important is the norovirus relationship to gastroenteritis. *Wien Klin Wochenschr* 2005; 177(23-24):785-88.

Fukuda S, Sasaki Y, Takao S, Seno M. Recombinant norovirus implicated in gastroenteritis outbreaks in Hiroshima Prefecture, Japan. *J Med Virol* 2008;80(5):921-28.

Fukuda S, Takao S, Shigemoto N, Tanizawa Y, Seno M. Transition of genotypes associated with norovirus gastroenteritis outbreaks in a limited area of Japan, Hiroshima Prefecture, during eight epidemic seasons. *Arch Virol* 2010; 155(1):111-15.

Gabbay YB, Glass RI, Monroe SS, Carcamo C, Estes MK, Mascarenhas JD, Linhares AC. Prevalence of antibodies to Norwalk virus among Amerindians in isolated Amazonian communities. *Am J Epidemiol* 1994; 1;139(7):728-33.

Galeano ME, Martinez M, Amarilla AA, Russomando G, Miagostovich MP, Parra GI, Leite JP. Molecular epidemiology of norovirus strains in Paraguayan children during 2004-2005: a new GII.4 cluster detected. *J Clin Virol*, submetido.

Gallimore CI, Lewis D, Taylor C, Cant A, Gennery A, Gray JJ. Chronic excretion of a norovirus in a child with cartilage hair hypoplasia (CHH). *J Clin Virol* 2004; 30 (2): 196-204.

García C, DuPont HL, Long KZ, Santos JI, Ko G. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8): 2997-3000.

Georgiadis S, Pilger DA, Pereira F, Cantarelli VV. Molecular evaluation of norovirus in patients with acute gastroenteritis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010;43(3):277-80.

Georgiadou SP, Loukeris D, Smilakou S, Daikos GL, Sipsas NV. Effective control of an acute gastroenteritis outbreak due to norovirus infection in a hospital ward in Athens, Greece, April 2011. *Euro Surveill* 2011; 16 (28): 19915.

Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee JS, Monroe SS. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000; 181(2):S254-61.

Glass RI, Parashar, UD, Estes MK. Norovirus Gastroenteritis. *N Engl J Med* 2009;361(18):1776-85.

Gomes KA, Stupka JA, Gómez J, Parra GI. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. *J Med Virol* 2007;79(11):1703-9.

Gomes KA, Stupka JA, Diana A, Parra GI. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis occurring in Argentina during 2005 and 2006. *Rev Argent Microbiol* 2008; 40(4):222-28.

Gómez-Santiago F, Ribas-Aparicio RM, García-Lozano H. Molecular characterization of human calicivirus associated with acute diarrheal disease in Mexican children. *Virology* 2012;9:54.

Götz H, de Jong B, Lindbäck J, Parment PA, Hedlund KO, Torvén M, Ekdahl K. Epidemiological investigation of a food-borne gastroenteritis outbreak caused by Norwalk-like virus in 30 day-care centres. *Scand J Infect Dis* 2002; 34(2):115-21.

Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis* 1994; 170(1):34-43.

Gordon I, Ingraham HS, Korn RF. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal isolates. *J Exp Med* 1947; 86(5):409-22.

Green J, Gallimore CI, Norcott JP, Lewis D, Brown DW. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol* 1995; 47(4):392-98.

Green KY, Belliot G, Taylor JL, Valdesuso J, Lew JF, Kapikian AZ, Lin FY. A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *J Infect Dis* 2002; 15;185(2):133-46.

Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. Human Caliciviruses. In: Knipe DM, Hoely PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p949-980. 2007

Greenberg H B, Kapikian AZ. Detection of Norwalk agent antibody and antigen by solid-phase radioimmunoassay and immune adherence hemagglutination assay. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 173(5 pt2):620-23.

Greenberg HB, Valdesuso JR, Kalica AR, Wyatt RG, McAuliffe VJ, Kapikian AZ, Chanock RM. Proteins of Norwalk virus. *J Virol* 1981; 37(3):994-99.

Greening GE, Hewitt J, Rivera-Aban M, Croucher D. Molecular epidemiology of norovirus gastroenteritis outbreaks in New Zealand from 2002-2009. *J Med Virol* 2012;84(9):1449-58.

Gutiérrez-Escolano AL, Brito ZU, del Angel RM, Jiang X. Interaction of cellular proteins with the 5' of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol* 2000; 74(18):8558-62.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 1999; 41:95-98.

Hall AJ, Rosenthal M, Gregoricus N, et al. Burden of noroviruses and other enteric viruses in community and outpatient settings, Georgia, United States [Presentation]. 4th International Conference on Caliciviruses, Santa Cruz, Chile; October 16–19, 2010. [Capturado dezembro 2012] Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6003a1.htm>.

Hall AJ, Rosenthal M, Gregoricus N, Greene SA, Ferguson J, Henao OL, Vinje J, Lopman BA, Parashar UD, Widdowson MA. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004–2005. Emerg Infect Dis 2011; 17(8):1381-88.

Hall AJ, Eisenbart VG, Etingüe AL, Gould LH, Lopman BA, Parashar UD. Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, United States, 2001-2008. Emerg Infect Dis 2012;18(10):1566-73.

Han TH, Kim CH, Chung JY, Park SH, Hwang ES. Emergence of norovirus GII-4/2008 variant and recombinant strains in Seoul, Korea. Arch Virol 2011;156(2):323-29.

Hardy ME, Estes MK. Completion of the Norwalk virus genome sequence. Virus Genes 1996; 12(3):289-92.

Hardy ME. Norovirus protein structure and function. FEMS Microbiol Lett 2005; 253(1):1-8

Hasman GS, Doan LT, K Nguyen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Noda M, Ushijima H. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. Arch Virol 2004; 149(9):1673-88

Hedberg CW, Osterholm MT. Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. Clin Microbiol Rev 1993;6(3):199-210.

Hewitt J, Bell D, Simmons GC, Rivera-Aban M, Wolf S, Greenin GE. Gastroenteritis outbreak caused by waterborne norovirus at New Zealand ski resort. Appl Environ Microbiol 2007; 73 (24):7853-57

Hewitt J, Rivera-Aban M, Greening GE. Evaluation of murine norovirus as a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies. J Appl Microbiol 2009;107(1):65–71.

HPA, Health Protection Agency. 2012 [Capturado dezembro 2012] Disponível em: <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/noroOBK/>.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. [Capturado dezembro 2012]. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rs>.

Iritani N, Seto Y, Kubo H, Haruki K, Ayata M, Ogura H. 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* 2002; 66(1):131–38.

Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Goto K, Ogura H, Seto Y. Molecular epidemiology of noroviruses detected in seasonal outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, from 1996-1997 to 2008-2009. *J Med Virol* 2010; 82(12):2097-105.

Iritani N, Kaida A, Abe N, Sekiguchi J, Kubo H, Takakura K, Goto K, Ogura H, Seto Y. Increase of GII.2 norovirus infections during the 2009-2010 season in Osaka City, Japan. *J Med Virol* 2012;84(3):517-25.

Isakbaeva ET, Widdowson MA, Beard RS, Bulens SN, Mullins J, Monroe SS, Bresee J, Sassano P, Cramer EH, Glass RI. Norovirus transmission on cruise ship. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(1):154-58.

Jeong AY, Jeong HS, Lee JS, Park YC, Lee SH, Hwang IG, Kim YJ, Kim YJ, Jo MY, Jung S, Kim K, Cheon DS. Occurrence of Norovirus Infections in Asymptomatic Food Handlers in South Korea. *J Clin Microbiol* 2012.

Jiang X, Graham DY, Wang K, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 1990; 250(4987): 1580-83.

Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992; 66(11): 6527-32.

Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 1993; 195(1): 51-61.

Jiang X, Wilton N, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, Barret E, Guerrero M, Ruiz-Palacios G, Green KY, Green J, Hale AD, Estes MK, Pickering LK, Matson DO. Diagnosis of human caliciviruses by use of Enzyme immunoassays. *J Infect Dis* 2000; 181(S2): 349-59.

Jimenez L, Chiang M. Virucidal activity of a quaternary ammonium compound disinfectant against feline calicivirus: a surrogate for norovirus. *Am J Infect Control* 2006;34(5):269–73.

Jin Y, Cheng WX, Yang XM, Jin M, Zhang Q, Xu ZQ, Yu JM, Zhu L, Yang SH, Liu N, Cui SX, Fang ZY, Duan ZJ. Viral agents associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Lanzhou, China. *J Clin Virol* 2009; 44(3):238-41.

Jin M, Sun JL, Chang ZR, Li HY, Liu N, Zhang Q, Cui SX, Zhang J, Wang ZJ, Duan ZJ. Outbreaks of noroviral gastroenteritis and their molecular characteristics in China, 2006 – 2007. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2010;31(5):549-53.

Jin M, Chen J, Zhang XH, Zhang M, Li HY, Cheng WX, Liu N, Tan M, Jiang T, Duan ZJ. Genetic diversity of noroviruses in Chinese adults: potential recombination hotspots and GII-4/Den Haag-specific mutations at a putative epitope. *Infect Genet Evol* 2011;11(7):1716-26.

Johansen K, Mannerqvist K, Allard A, Andersson Y, Burman LG, Dillner L, Hedlund KO, Jonsson K, Kumlin U, Leitner T, Lysen M, Thorhagen M, Tiveljung-Lindell A, Wahlström C, Zwegyberg-Wirgart B, Widell A. Norovirus strains belonging to the GII.4 genotype dominate as a cause of nosocomial outbreaks of viral gastroenteritis in Sweden 1997--2005. Arrival of new variants is associated with large nation-wide epidemics. *J Clin Virol* 2008;42(2):129-34.

Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Multiple challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis* 1990; 161:18–21.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4):1548-57.

Kamel AH, Ali MA, El-Nady HG, de Rougemont A, Pothier P, Belliot G. Predominance and circulation of enteric viruses in the region of Greater Cairo, Egypt. *J Clin Microbiol* 2009;47(4):1037–45

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10(5):1075-81.

Kapikian, A. Z., H. B. Greenberg, W. L. Cline, A. R. Kalica, R. G. Wyatt, H. D. James, Jr., N. L. Lloyd, R. M. Chanock, R. W. Ryder, and H. W. Kim. Prevalence of antibody to the Norwalk agent by a newly developed immune adherence hemagglutination assay. *J Med Virol* 1978; 2(4):281–94.

Kaplan JE, Feldman R, Campbell DS, Lookabaugh C, Gary GW. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am J Public Health* 1982;72(12):1329-32.

Karst SM. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses* 2010; 2(3):748-81.

Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. *Environ Sci Technol* 2010; 44(18): 7116-22.

Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Phanuwat C, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Genetic diversity of genogroup IV noroviruses in wastewater in Japan. *Lett Appl Microbiol* 2011;52(2):181-4.

Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC. Inactivation of Norwalk virus drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol* 1985; 50: 261-64.

Keusch GT, Fontaine O, Bhargava A, Boschi-Pinto C, Bhutta ZA, Gotuzzo E, Rivera JA, Chow J, Sonbol A, Shahid-Salles, Laxminarayan R. Diarrheal diseases. In: Jamison

DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Prabhat J, Anne M, Philip M editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries*, 2nd edition. Washington (DC): World Bank; 2006. p. 371-88.

Khan RR, Lawson AD, Minnich LL, Martin K, Nasir A, Emmett MK, Welch CA, Udall JN. Gastrointestinal Norovirus Infection Associated With Exacerbation of Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;48(3): 328–33.

Kimura MA. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16(2):111–20.

Kimura H, Nitami K, Mizuguchi A. Descriptive epidemiology for two outbreak cases of norovirus gastroenteritis in an elementary school. *Nihon Koshu Eisei Zasshi* 2012; 59(2):101-11.

Kirkwood CD, Streitberg R. Calicivirus shedding in children after recovery from diarrhoeal disease. *J Clin Virol* 2008; 43(3):346–48.

Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, Diraphat P, Sujirarat D, Khamrin P, Ushijima H. Norovirus GII-4 2006b variant circulating in patients with acute gastroenteritis in Thailand during a 2006-2007 study. *J Med Virol* 2010; 82(5):854-60.

Kojima S, Kaheyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Vir Methods* 2002; 100(1-2): 107–14.

Koopmans M, Vinjé J, Duizer E, de Wit M, van Duynhoven Y. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in Netherlands. *Novartis Found Symp* 2001; 238:197-214.

Korsager B, Hede S, Bøggild H, Böttiger BE, Mølbak K. Two outbreaks of norovirus infections associated with the consumption of imported frozen raspberries, Denmark, May-June 2005. *Euro Surveill* 2005;10(6):E050623.

Kroneman A, Vennema H, Harris J, Reuter G, von Bonsdorff CH, Hedlund KO, Vainio K, Jackson V, Pothier P, Koch J, Schreier E, Böttiger BE, Koopmans M; Food-borne viruses in Europe network. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveill* 2006;11(12):E061214.

Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort HV, Peñaranda S, Oberste MS, Vinjé J, Koopmans M. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol* 2011; 51(2):121-25.

Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, von Bonsdorff CH. Outbreak of viral Gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 1999; 180(6): 1771-76.

Lai CC, Wang YH, Wu CY, Hung CH, Jiang DD, Wu FT. A norovirus outbreak in a nursing home: Norovirus shedding time associated with age. *J Clin Virol* 2012; S1386-6532(12):00392-7.

La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Muscillo M. Detection of genogroup IV noroviruses in environmental and clinical samples and partial sequencing through rapid amplification of cDNA ends. *Arch Virol* 2008; 153(11):2077–83.

La Rosa G, Iaconelli M, Pourshaban M, Fratini M, Muscillo M. Molecular detection and genetic diversity of norovirus genogroup IV: a yearlong monitoring of sewage throughout Italy. *Arch Virol* 2010; 155(4):589-93.

La Rosa G, Fratini M, Spuri V, Vennarucci V, Guercio A, Purpari G, Muscillo M. GIV noroviruses and other enteric viruses in bivalves: a preliminary study. *New Microbiol.* 2012; 35(1):27-34.

Le Guyader F, Estes MK, Hardy ME, Neill FH, Green J, Brown DW, Atmar RL. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Arch Virol* 1996; 141(11):2225-35.

Lindell AT, Grillner L, Svensson L, Wirgart BZ. Molecular epidemiology of norovirus infections in Stockholm, Sweden, during the years 2000 to 2003: association of the GGIIb genetic cluster with infection in children. *J Clin Microbiol* 2005;43(3):1086-92.

Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, LePendu J, Baric R. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med* 2003; 9(5):548–53.

Lindesmith L, Moe C, Lependu J, Frelinger JA, Treanor J, Baric RS. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *J Virol* 2005; 79(5):2900-09.

Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, Baric RS. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* 2008; 5(2):e31

Lindesmith LC, Donaldson E, Leon J, Moe CL, Frelinger JA, Johnston RE, Weber DJ, Baric RS. Heterotypic humoral and cellular immune responses following Norwalk virus infection. *J Virol* 2010; 84(4): 1800–15.

Lindesmith LC, Donaldson EF, Baric RS. Norovirus GII.4 strain antigenic variation. *J Virol* 2011; 85(1): 231–42.

Liu BL, Lambden PR, Gunther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 1999;73(1):819-25.

Liu P, Chien Y, Papafragkou E, Hsiao H, Jaykus L, Moe C. Persistence of Human Noroviruses on Food Preparation Surfaces and Human Hands. *Food Environ Virol* 2009; 1(3-4):141-47.

Ljubin-Sternak S, Lukic-Grlic A, Fiore L, DI-Bartolo I, Ruggeri FM, Bukovskisimonoski G S. Norovirus genotypes involved in the outbreaks of

gastroenteritis in Croatia during the winter season 2004-2005. *Acta Virol* 2007;51(3):189-94.

Lopman BA, Brown DW, Koopmans M. Human Calicivirus in Europe. *Journal of Clinical Virology*. 2002; 24(3): 137-60.

Lopman BA, Reacher M, Gallimore C, Adak GK, Gray JJ, Brown DW. A summertime peak of "winter vomiting disease": surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. *BMC Public Health*. 2003;3:13.

Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis* 2004; 39(3):318-24.

Lopman B. Air Sickness: Vomiting and Environmental Transmission of Norovirus on Aircraft *Clinical Infectious Diseases* 2011a; 53(6):521–22.

Lopman BA, Hall AJ, Curns AT, Parashar UD: Increasing rates of gastroenteritis hospital discharges in US adults and the contribution of norovirus, 1996–2007. *Clin Infect Dis* 2011b; 52(4):466-74.

Lopman B, Gastañaduy P, Park GW, Hall AJ, Parashar UD, Vinjé J. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Curr Opin Virol* 2012; 2(1):96-102.

Madeley CR, Cossgrove BP. Letter: Calicivirus in man. *Lancet* 1976; 1(7952):199-200.

Mahar JE, Kirkwood CD. Characterization of norovirus strains in Australian children from 2006 to 2008: prevalence of recombinant strains. *J Med Virol* 2011; 83(12): 2213-19.

Marshall JA, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Cox BJ, Catton MG, Kelly H, Wright PJ. Incidence and characteristics of endemic Norwalk-like virus-associated gastroenteritis. *J Med Virol* 2003;69(4):568-78.

Marshall JA, Bruggink LD. The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights. *Int J Environ Res Public Health* 2011;8(4):1141-49.

Martínez N, Espul C, Cuello H, Zhong W, Jiang X, Matson DO, Berke T. Sequence diversity of human caliciviruses recovered from children with diarrhea in Mendoza, Argentina, 1995-1998. *J Med Virol* 2002;67(2):289-98.

Mason HS, Ball JM, Shi J-J, Estes MK, Arntzen CJ. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5335–5340.

Mathijs E, Denayer S, Palmeira L, Botteldoorn N, Scipioni A, Vanderplasschen A, Thiry E, Dierick K. Novel norovirus recombinants and of GII.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium. *Virol J* 2011;8:310.

Matthews RE. Third report of International Comitee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 1979; 12(3-5):129-296.

Matthews JE, Dickey BW, Miller RD, Felzer JR, Dawson BP, Lee AS, Rocks JJ, Kiel J, Montes JS, Moe CL, Eisenberg JN, Leon JS. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiol Infect* 2012;140(7):1161-72.

Mattison K, Shukla A, Cook A, Pollari F, Friendship R, Kelton D, Bidawid S, Farber JM. Human noroviruses in swine and cattle. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(8):1184–88.

Mattner F, Sohr D, Heim A, Gastmeier P, Vennema H, Koopmans M. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(1):69-74.

Maunula L, Roivainen M, Keränen M, Mäkela S, Söderberg K, Summa M, von Bonsdorff CH, Lappalainen M, Korhonen T, Kuusi M, Niskanen T. Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Euro Surveill* 2009; 14(49):19435.

McAllister G, Holmes A, Garcia L, Cameron F, Cloy K, Danial J, Cepeda JA, Simmonds P, Templeton KE. Molecular epidemiology of norovirus in Edinburgh healthcare facilities, Scotland 2007-2011. *Epidemiol Infect* 2012;140(12):2273-81.

Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ, Thumfart JO. Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* 2000; 276:349-363.

Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol* 2010;84(16):8085-97.

Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 2000; 181(2):S284-87.

Mumphrey SM, Changotra H, Moore TN, Heimann-Nichols ER, Wobus CE, Reilly MJ, Moghadamfalahi M, Shukla D, Karst SM. Murine Norovirus 1 Infection Is Associated with Histopathological Changes in Immunocompetent Hosts, but Clinical Disease Is Prevented by STAT1-Dependent Interferon Responses. *J Virol* 2007; 81(7):3251-63.

Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FM, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol* 2008;153(5):957-60.

Nataraju SM, Pativada M, Chatterjee D, Nayak MK, Ganesh B, Bhattacharya MK, Ramamurthy T, Ganguly S, Saha DR, Rajendran K, Ghosh M, Kobayashi

N, Krishnan T. Molecular epidemiology of norovirus infections in children and adults: sequence analysis of region C indicates genetic diversity of NVGII strains in Kolkata, India. *Epidemiol Infect* 2011;139(6):910-18.

Nayak MK, Chatterjee D, Nataraju SM, Pativada M, Mitra U, Chatterjee MK, Saha TK, Sarkar U, Krishnan T. A new variant of Norovirus GII.4/2007 and inter-genotype recombinant strains of NVGII causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. *J Clin Virol* 2009;45(3):223-29.

NCBI, Basic Local Alignment Search Tool. 2012a. [Capturado dezembro 2012]. Disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

NCBI, *GenBank*. 2012b. [Capturado dezembro 2012]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

Neill JD, Mengeling WL. Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res* 1988; 11(1): 59–72.

Nenonen NP, Hannoun C, Larsson CU, Bergström T. Marked genomic diversity of norovirus genogroup I strains in a waterborne outbreak. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(6):1846-52.

Nguyen TA, Hoang L, Pham le D, Hoang KT, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Norovirus and sapovirus infections among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City during 2005-2006. *J Trop Pediatr* 2008; 54(2):102-13.

Nilsson M, Hedlund K, Thorhagen M, Johansen K. 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* 2003; 77(24):13117–24.

Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, Estes MK, Seto Y, Monroe SS, Glass RI. Correlation of patient immune responses with genetically characterized Small Round-Structured Viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990-1995. *J Med Virol* 1997; 53(4): 372–83.

Noel JS, Frankhauser RL, Ando T, Monroe SS, Glass RI. Identification of a distinct common strain of “Norwalk-like viruses” having a global distribution. *J Infect Dis* 1999; 179:1334–44.

Noronet, Noronet Web Site. 2012. [Capturado outubro 2012]. Disponível em: <http://www.rivm.nl/en/Topics/Topics/N/NoroNet>.

NORS, National Outbreak Reporting System. 2012. [Capturado dezembro 2012]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/outbreaknet/nors/>

Okada M, Ogawa T, Yoshizumi H, Kubonoya H, Shinozaki K. Genetic variation of the norovirus GII-4 genotype associated with a large number of outbreaks in Chiba prefecture, Japan. *Arch Virol* 2007;152(12):2249-52.

Okoh AI, Sibanda T, Gusha SS. Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *Int J Environ Res Public Health* 2010; 7(6):2620-37.

O'Ryan ML, Mamani N, Gaggero A, Avendaño LF, Prieto S, Peña A, Jiang X, Matson DO. Human caliciviruses are a significant pathogen of acute sporadic diarrhea in children of Santiago, Chile. *J Infect Dis* 2000; 182(5):1519-22.

Otter JA, Yezli S, French GL. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011; 32(7):687-99.

Pang XL, Honma S, Nakata S, Vesikari T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis* 2000; 181(2):S288-94.

Pang XL, Preiksaitis JK, Lee B. Multiplex Real Time RT-PCR for detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol* 2005; 33(2):168-71 .

Pang XL, Preiksaitis JK, Wong S, Li V, Lee BE. Influence of novel norovirus GII.4 variants on gastroenteritis outbreak dynamics in Alberta and the Northern Territories, Canada between 2000 and 2008. *PLoS One* 2010; 16;5(7):e11599.

Papaventsis DC, Dove W, Cunliffe NA, Nakagomi O, Combe P, Grosjean P, Hart CA. Norovirus infection in children with acute gastroenteritis, Madagascar, 2004-2005. *Emerg Infect Dis* 2007;13(6):908-11.

Parashar UD, Li JF, Cama R, DeZalia M, Monroe SS, Taylor DN, Figueroa D, Gilman RH, Glass RI. Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. *J Infect Dis* 2004; 15;190(6):1088-92.

Park GW, Vinjé J, Sobsey MD. The Comparison of UV and Chlorine Disinfection Profiles of Murine Norovirus (MNV-1), Feline Calicivirus (FCV), and Coliphage MS2 [Presentation]. American Society for Microbiology (ASM), Orlando, Florida; May 21–25, 2006.

Park GW, Boston DM, Kase JA, Sampson MN, Sobsey MD. Evaluation of liquid- and fog-based application of Sterilox hypochlorous acid solution for surface inactivation of human norovirus. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:4463–68.

Park S, Jung J, Oh S, Jung H, Oh Y, Cho S, Cho S, Cho S, Park H, Jo N, Bae K, Choi S, Kim B, Kim J, Chae Y, Jung H, Cheon D, Kim H. Characterization of norovirus infections in Seoul, Korea. *Microbiol Immunol* 2012;56(10):700-07.

Parks CG, Moe CL, Rhodes D, Lima A, Barrett L, Tseng F, Baric R, Talal A, Guerrant R. Genomic diversity of "Norwalk like viruses" (NLVs): pediatric infections in a Brazilian shantytown. *J Med Virol* 1999; 58(4):426-34.

Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 1977; 297(2):86-89.

Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(8):1224-31.

Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol* 2009; 44(1):1-8.

Patterson W, Haswell P, Fryers PT, Green J. Outbreak of small round structured virus gastroenteritis arose after kitchen assistant vomited. *Commun Dis Rep CDC Rev* 1997; 7(7):101-03.

Pérez-Sautu U, Sano D, Guix S, Kasimir G, Pintó RM, Bosch A. Human norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment, Spain. *Environ Microbiol* 2012;14(2):494-502.

Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Nishimura T, Yagyu F, Okitsu S, Müller WE, Maneeekarn N, Ushijima H. Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GI Ib among infants and children with diarrhea in Japan. *J Med Virol*. 2006;78(7):971-78.

Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Takanashi O, Okitsu S, Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in noroviruses. *J Med Virol* 2007; 79(9):1388-400.

Phillips G, Tam CC, Rodrigues LC, Lopman B. Risk factors for symptomatic and asymptomatic norovirus infection in the community. *Epidemiol Infect* 2010; 139(11): 1676-86.

Ponka A, Maunula L, Von Bonsdorff CH, Lyytikäinen O. Outbreak of calicivirus gastroenteritis associated with eating frozen raspberries. *Euro Surveillance* 1999; 4(6):66-69.

Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes M K. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 1999; 286(5438) 287-90.

Prüss-Üstün A, Bos R, Gore F, Bartram J. Safer water, better health: costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health. World Health Organization (WHO) [periódico na internet], 2008. [acesso em 28 dezembro 2012]. [aproximadamente 60 p.]. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/safer_water/en/.

Puustinen L, Blazevic V, Salminen M, Hämäläinen M, Räsänen S, Vesikari T. Noroviruses as a major cause of acute gastroenteritis in children in Finland, 2009-2010. *Scand J Infect Dis* 2011;43(10):804-8.

Ramirez S, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C, Martella V, Arista S. Emerging GII.4 norovirus variants affect children with diarrhea in Palermo, Italy in 2006. *J Med Virol* 2009;81(1):139-45.

Ramirez K, Wahid R, Richardson C, Bargatze RF, El-Kamary SS, Sztein MB, Pasetti MF. Intranasal vaccination with an adjuvanted Norwalk virus-like particle vaccine elicits antigen-specific B memory responses in human adult volunteers. *Clin Immunol* 2012;144(2):98-108.

Räsänen S, Lappalainen S, Salminen M, Huhti L, Vesikari T. Noroviruses in children seen in a hospital for acute gastroenteritis in Finland. *Eur J Pediatr* 2011;170(11):1413-18.

Reeck A, Kavanagh O, Estes MK, Opekun AR, Gilger MA, Graham DY, Atmar RL. Serologic correlate of protection against norovirus-induced gastroenteritis. *J Infect Dis* 2010; 202(8):1212–18.

Reuter G, Pankovics P, Szucs G. Genetic drift of norovirus genotype GII-4 in seven consecutive epidemic seasons in Hungary. *J Clin Virol* 2008;42(2):135-40.

Rhinehart E, Walker S, Murphy D, O'Reilly K, Leeman P. Frequency of outbreak investigations in US hospitals: results of a national survey of infection preventionists. *Am J Infect Control* 2012; 40(1):2-8.

Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, Miagostovich MP, Spano LC. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(2):201-06.

Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, Cotterill H, Ratcliffe S, Jenkins M, Appleton H, Gallimore CI, Gray JJ, Brown DW. Evaluation of commercial Elisa for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol* 2003; 26(1):109-15.

Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinje J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, Koopmans M. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2002;35(3):246–53.

Rockx B, Baric RS, de Grijns I, Duizer E, Koopmans MP. Characterization of the homo and heterotypic immune responses after natural norovirus infection. *J Med Virol* 2005; 77(3):439–46.

Sarvikivi E, Roivainen M, Maunula L, Niskanen T, Korhonen T, Lappalainen M, Kuusi M. Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries. *Epidemiol Infect* 2012;140(2):260-67.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011;17(1):7-15.

Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med* 1973;288(25): 1318–23.

Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. The small intestinal lesion induced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Infect Dis* 1974;129(6): 705–08.

Schultz AC, Vega E, Dalsgaard A, Christensen LS, Nørrung B, Hoorfar J, Vinjé J. Development and evaluation of novel one-step TaqMan realtime RT-PCR assays for the detection and direct genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Clin Virol* 2011; 50(3):230-34.

Scipioni A, Mauroy A, Vinjé J, Thiry E. Review Animal noroviruses. *Vet J* 2008; 178(1):32-45.

Seitz SR, Leon JS, Schwab KJ, Lyon GM, Dowd M, McDaniels M, Abdulhafid G, Fernandez ML, Lindesmith LC, Baric R, Moe CL. Norovirus human infectivity and persistence in water. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(19): 6884-88.

Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen RJ, and M. Koopmans. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol* 2007a; 81(18):9932-41.

Siebenga JJ, Vennema H, Duizer E, Koopmans MP. Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4, The Netherlands, 1994-2005. *Emerg Infect Dis* 2007b; 13(1):144-46.

Siebenga J, Kroneman A, Vennema H, Duizer E, Koopmans M. Food-borne viruses in Europe network report: the norovirus GII.4 2006b (for US named Minerva-like, for Japan Kobe034-like, for UK V6) variant now dominant in early seasonal surveillance. *Euro Surveill.* 2008; 10;13(2). pii: 8009.

Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, Ho EC, Lim W, Choudekar A, Broor S, Halperin T, Rasool NB, Hewitt J, Greening GE, Jin M, Duan ZJ, Lucero Y, O’Ryan M, Hoehne M, Schreier E, Ratcliff RM, White PA, Iritani N, Reuter G, Koopmans M. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis* 2009; 200(5):802-12.

Simon A, Schildgen O, Maria Eis-Hubinger A, Hasan C, Bode U, Buderus S, Engelhart S, Fleischhack G. Norovirus outbreak in a pediatric oncology unit. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41(6):693–99.

Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MC, Maranhão AG, Rocha LN, Ramírez ML, Monroe SS, Glass RI, Gentsch J. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007;13(8):1244-46.

Sosnovtsev SV, Prikhod'ko EA, Belliot G, Cohen JI, Green KY. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Res* 2003; 94(1):1–10.

Sousa TT, Souza M, Fiaccadori FS, Borges AM, Costa PS, Cardoso Dd. Human bocavirus 1 and 3 infection in children with acute gastroenteritis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(6):800-04.

Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* 1998; 143(6): 1215–21.

Sugieda M, Nakajima S. Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus “Norwalk-like viruses”. *Virus Res* 2002; 87(2):165–72.

Sukhrie FH, Siebenga JJ, Beersma MF, Koopmans M. Chronic shedders as a reservoir for nosocomial transmission of norovirus. *J Clin Microbiol* 2010; 48(11):4303-05.

SVS/MS, Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. 2013. [Capturado janeiro de 2013]. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_dda.pdf.

Tacket CO, Szein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Estes MK. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol* 2003;108(3):241-7.

Takanashi S, Wang Q, Chen N, Shen Q, Jung K, Zhang Z, Yokoyama M, Lindesmith LC, Baric RS, Saif LJ. Characterization of emerging GII.g/GII.12 noroviruses from a gastroenteritis outbreak in the United States in 2010. *J Clin Microbiol* 2011; 49(9):3234-44.

Talal AH, Moe CL, Lima AA, Weigle KA, Barret L, Bangdieala SE, Estes MK, Guerant RL. Soroprevalence and soroincidence of Norwal-like vírus infection among brazilian infants and children. *J Med Virol* 2000; 61(1):117-24.

Tamura T, Nishikawa M, Anh DD, Suzuki H. Molecular epidemiological study of rotavirus and norovirus infections among children with acute gastroenteritis in Nha Trang, Vietnam, December 2005-June 2006. *Jpn J Infect Dis* 2010; 63(6):405-11.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 2011; 28(10): 2731-39.

Tan M, Jiang X. The P Domain of Norovirus Capsid Protein Forms a Subviral Particle That Binds to Histo-Blood Group Antigen Receptors. *J Virol* 2005; 79(22):14017–30.

Tan M, Jiang X. Norovirus-host interaction: implications for disease control and prevention. *Expert Rev Mol Med* 2007;9(19):1-22.

Tan M, Jiang X. Norovirus-host interaction: multi-selections by human histo-blood group antigens. *Trends Microbiol.* 2011;19(8):382-8.

Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, Le Pendu J, Calderon RL. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol* 2008; 80(8):1468-76.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22(22):4673-80.

Thornhill TS, Wyatt RG, Kalica AR, Dolin R, Chanock RM, Kapikian AZ. Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* 1977; 135(1):20-7.

Thornley CN, Emslie NA, Sprott TW, Greening GE, Rapana JP. Recurring norovirus transmission on an airplane. *Clin Infect Dis* 2011; 53(6):521-26.

Thornton AC, Jennings-Conklin KS, McCormick MI. Norovirus: Agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Manag & Response* 2004; 2(1): 4-9.

Thouillot F, Delhostal C, Edel C, Bettinger A, Pothier P, Ambert-Balay K, Meffre C, Alsibai S. Gastroenteritis outbreaks in elderly homes in the east of France during winter 2009/10: aetiology research for a series of 37 outbreaks. *Euro Surveill* 2012;17(9):20103.

Timenetsky Mdo C, Kisielius JJ, Grisi SJ, Escobar AM, Ueda M, Tanaka H. Rotavirus, adenovirus, astrovirus, calicivirus and small round virus particles in feces of children with and without acute diarrhea, from 1987 to 1988, in the greater São Paulo. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1993;35(3):275-80.

Tompkins DS, Hudson MJ, Smith HR, Eglin RP, Wheeler JG, Brett MM, Owen RJ, Brazier JS, Cumberland P, King V, Cook PE. A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls. *Commun Dis Public Health* 1999;2(2):108-13.

Tran TNH, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, Nakagomi O. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: Global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J Clin Virol* 2012; pii: S1386-6532(12)00431-3.

Trang NV, Luan le T, Kim-Anh le T, Hau VT, Nhung le TH, Phasuk P, Setrabutr O, Shirley H, Vinjé J, Anh DD, Mason CJ. Detection and molecular characterization of noroviruses and sapoviruses in children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Vietnam. *J Med Virol* 2012; 84(2):290-97.

Trivedi TK, DeSalvo T, Lee L, Palumbo A, Moll M, Curns A, Hall AJ, Patel M, Parashar UD, Lopman BA. Hospitalizations and mortality associated with norovirus outbreaks in nursing homes, 2009-2010. *JAMA* 2012; 308(16):1668-75.

Troeger H, Loddenkemper C, Schneider T, Schreier E, Epple HJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut* 2009; 58(8):1070-77.

Tu ET, Bull RA, Greening GE, Hewitt J, Lyon MJ, Marshall JA, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the

spread of norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. *Clin Infect Dis* 2008; 46(3):413-20.

van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden J, Fonager J, Hewitt J, Iritani N, Kroneman A, Vennema H, Vinje J, White P, Koopmans M; on behalf of NoroNet. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill* 2013;18(1).

Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Williams K, Lee D, Vinjé J. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerg Infect Dis* 2011a; 17(8):1389-95.

Vega E, Vinjé J. Novel GII.12 norovirus strain, United States, 2009-2010. *Emerg Infect Dis* 2011b; 17(8):1516-18.

Verhoef L, Vennema H, van Pelt W, Lees D, Boshuizen H, Henshilwood K, Koopmans M. Use of norovirus genotype profiles to differentiate origins of foodborne outbreaks. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(4):617-24.

Verma H, Chitambar SD, Gopalkrishna V. Circulation of Aichi virus genotype B strains in children with acute gastroenteritis in India. *Epidemiol Infect* 2011;139(11):1687-91.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich M. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(7):602-6.

Vidal R, Solari V, Mamani N, Jiang X, Vollaire J, Roessler P, Prado V, Matson DO, O'Ryan ML. Caliciviruses and foodborne gastroenteritis, Chile. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(7):1134-37.

Vinjé J, Koopmans MP. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996; 174(3):610-15.

Vinje J, Altena S, Koopmans M. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1997; 176(5):1374-78.

Vinjé J, Koopmans MP. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol* 2000; 38(7): 2595-601.

Vinjé J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. 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* 2004; 116(2):109-17.

Vivancos R, Shroufi A, Sillis M, Aird H, Gallimore CI, Myers L, Mahgoub H, Nair P. Food related norovirus outbreak among people attending two barbeques:

epidemiological, virological and environmental investigation. *Int J Infect Dis* 2009; 13(5): 629-35.

Wadl M, Scherer K, Nielsen S, Diedrich S, Ellerbroek L, Frank C, Gatzler R, Hoehne M, Johne R, Klein G, Koch J, Schulenburg J, Thielbein U, Stark K, Bernard H. Food-borne norovirus outbreak at a military base, Germany 2009. *BMC Infect Dis* 2010; 10:30.

Wang QH, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(12):1874-81.

Westhoff TH, Vergoulidou M, Loddenkemper C, Schwartz S, Hofmann J, Schneider T, Zidek W, van der Giet M. Chronic norovirus infection in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24(3):1051–1053.

WHO, World Health Organization. 2011. [Capturado dezembro 2012]. Disponível em: www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index1.html.

Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Bresee JS, Beard RS, Bulens SN, Charles M, Chege W, Isakbaeva E, Wright JG, Mintz E, Forney D, Massey J, Glass RI, Monroe SS. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus-United States, 2002. *J Infect Dis* 2004;190(1):27-36.

Wikswø ME, Cortes J, Hall AJ, Vaughan G, Haward C, Gregoricus N, Cramer EH. Disease transmission and passenger behaviors during a high morbidity Norovirus outbreak on a cruise ship, January 2009. *Clin Infect Dis* 2011; 52(9):1116-22.

Wingfield T, Gallimore CI, Xerry J, Gray JJ, Klapper P, Guiver M, Blanchard TJ. Chronic norovirus infection in an HIV-positive patient with persistent diarrhoea: a novel cause. *J Clin Virol* 2010; 49(3):219-22.

Wyatt R G, Dolin R, Blacklow NR, DuPont HL, Buscho RF, Thornhill TS, Kapikian AZ, Chanock RM. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis* 1974; 129(6):709-14.

Xavier MP, Oliveira SA, Ferreira MS, Victoria M, Miranda V, Silva MF, Strina A, Barreto ML, Miagostovich MP, Leite JP. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42(5):438–44.

Yap J, Qadir A, Liu I, Loh J, Tan BH, Lee VJ. Outbreak of acute norovirus gastroenteritis in a military facility in Singapore: a public health perspective. *Singapore Med J* 2012; 53(4):249-54.

Yassin MA, Kirby A, Mengistu AA, Arbide I, Dove W, Beyer M, Cunliffe NA, Cuevas LE. Unusual norovirus and rotavirus genotypes in Ethiopia. *Paediatr Int Child Health* 2012;32(1):51-5.

Yen C, Wikswo M, Lopman B, Hall A. Temporal trends in norovirus activity— United States, January 2007–April 2010 [Presentation]. 4th International Conference on Caliciviruses, Santa Cruz, Chile; October 16–19, 2010.

Yu JH, Kim NY, Kon YJ, Lee HJ. Epidemiology of foodborne Norovirus outbreak in Incheon, Korea. *J Korean Med Sci* 2010; 25(8):1128-33.

Zahorsky, J. Hyperemesis hemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr* 1929; 46:391–95.

Zeng M, Gong Z, Zhang Y, Zhu Q, Wang X. Prevalence and genetic diversity of norovirus in outpatient children with acute diarrhea in Shanghai, China. *Jpn J Infect Dis* 2011;64(5):417-22.

Zeng M, Xu X, Zhu C, Chen J, Zhu Q, Lin S, Jie Y, Shu X. Chinese Pediatric Study Group of Norovirus Diarrhea. Clinical and molecular epidemiology of norovirus infection in childhood diarrhea in China. *J Med Virol* 2012; 84(1):145-51.

Zhang X, Buehner NA, Hutson AM, Estes MK, Mason HS. Tomato is a highly effective vehicle forexpression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnol. J* 2006;4(4):419–432.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006; 346(2):312–23.

Zheng DP, Widdowson MA, Glass RI, Vinjé J. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J Clin Microbiol* 2010; 48(1):168-77.

Zintz C, Bok K, Parada E, Barnes-Eley M, Berke T, Staat MA, Azimi P, Jiang X, Matson DO. Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. *Infect Genet Evol* 2005;5(3):281–90.

10-Anexos

10.1- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 15 de maio de 2006.

PARECER

Título do Projeto: "Detecção e Identificação de Vírus Responsáveis pela Etiologia da Gastroenterite Aguda"
Protocolo CEP: 311/06
Pesquisador Responsável: José Paulo Gagliardi Leite
Instituição: IOC
Deliberação: APROVADO

O estudo tem como objetivos detectar rotavirus A e C, astrovirus, calicivirus humanos e adenovirus entéricos, em amostras fecais de gastroenterite agudas, além de implementar metodologias para a detecção de outros vírus, associados a estas infecções, com caracterização molecular e análises genealógicas, na busca de variações geográficas e/ou temporais.

Segundo a Organização Panamericana de Saúde as gastroenterites agudas são, após as infecções respiratórias agudas, constituem o mais importante agravo à saúde em crianças menores de cinco anos. Associados ao quadro de desnutrição, estas são responsáveis por mais de 3,3 milhões de mortes no mundo, sendo que um milhão destas ocorre na América Latina. O trabalho pretende identificar outros vírus gastroentéricos causadores de doenças em nosso meio, objetivando a criação de um Programa de Vigilância Epidemiológica e Laboratorial de detecção e caracterização molecular (identificação) de vírus, no sentido de auxiliar a avaliação do impacto na introdução da vacina em nosso país.

Trata-se de um projeto integrado, envolvendo atividades de Graduação e Pós-Graduação.

Serão utilizadas fezes obtidas de amostras encaminhadas para diagnóstico e identificação viral que estão armazenadas no laboratório, onde a pesquisa será executada, ou enviadas pelos LACENs, ou unidades hospitalares.

O projeto não oferece nenhum risco físico aos participantes com referência à obtenção do material biológico para estudo.

O TCLE está claro, com as informações necessárias.

A equipe envolvida no estudo é qualificada para tal e o projeto será desenvolvido no Laboratório de Referência para Rotavíruses, do Depto. de Imunologia, do Instituto Oswaldo Cruz.

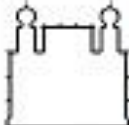
Após análise das respostas às pendências emitidas no parecer datado de 28/04/2006 por este colegiado, tendo por referência as normas e diretrizes da Resolução 196/96, foi decidido pela APROVAÇÃO do referido protocolo.

Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais/anuais e relatório final do projeto de pesquisa.

Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo original deverá ser submetida para apreciação do CEP/Fiocruz.

Alda Maria Da-Cruz
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz

10.2-Ficha Epidemiológica

 <p>Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz Instituto Oswaldo Cruz</p> <p>Laboratório de Virologia Comparada Deptº. de Virologia - Pav. Cardoso Fontes Av. Brasil, 4365 - CEP 21045-900 Tel: 2598-4417 Fax: 2598-4491</p>	Local: _____										
	Contato (nome): _____ Contato (fone): _____ Contato (fax): _____										
	Prontuário: _____ ou Boletim de Emergência: _____										
Data da Coleta: __/__/__ Data: __/__/__ de Registro: Virologia _____ <small>(preenchido na FIOCRUZ)</small>											
INFORMAÇÕES CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS											
Nome: _____											
Endereço (bairro/município): _____											
Sexo: 1- M <input type="checkbox"/> 2- F <input type="checkbox"/> Idade: ____ anos ____ meses											
Diarréia há _____ dias.											
Presença de:											
3- Muco:	<table border="0"> <tr> <td>Sim</td> <td>Não</td> <td>8- Inapetência:</td> <td>Sim</td> <td>Não</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>	Sim	Não	8- Inapetência:	Sim	Não	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sim	Não	8- Inapetência:	Sim	Não							
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>							
4- Sangue:	<table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>9- Coriza:</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	9- Coriza:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	9- Coriza:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>							
5- Febre:	<table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>10- Tosse:</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	10- Tosse:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	10- Tosse:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>							
6- Vômito:	<table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>11- Rash cutâneo:</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	11- Rash cutâneo:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	11- Rash cutâneo:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>							
7- Dor abdominal:	<table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>12- Desidratação</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	12- Desidratação	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>					
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	12- Desidratação	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>							
Tipo de alimentação:											
13- L.M. exclusivo <input type="checkbox"/>	14- Mista <input type="checkbox"/> 15- Outros <input type="checkbox"/>										
16- Possui animal em casa?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Qual? _____										
17- Uso de antibióticos?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Qual? _____										
Observações:											
_____ <small>(ass. e carimbo)</small>											