



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

**CARACTERIZAÇÃO DAS INFECÇÕES POR NOROVÍRUS NAS
HOSPITALIZAÇÕES PEDIÁTRICAS POR GASTRENERITE NA CIDADE DE
BELÉM, PARÁ.**

JONES ANDERSON MONTEIRO SIQUEIRA

Belém – Pará

2012

JONES ANDERSON MONTEIRO SIQUEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DAS INFECÇÕES POR NOROVÍRUS NAS HOSPITALIZAÇÕES
PEDIÁTRICAS POR GASTRENTERITE NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais (área de concentração de Patologia das Doenças Tropicais), Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Dr^a Yvone Gabbay Mendes

Belém – Pará

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA

Siqueira, Jones Anderson Monteiro.

Caracterização das infecções por norovírus nas hospitalizações pediátricas por gastroenterite na cidade de Belém, Pará / Jones Anderson Monteiro Siqueira; orientadora: Yvone Gabbay Mendes – 2012.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém–Pará, 125p, 2012.

1. Gastroenterite – Crianças – Belém. 2. Norovírus – Belém (PA). 3. Infecções por norovírus – Belém (PA). I. Mendes, Yvone Gabbay, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 618.923427

JONES ANDERSON MONTEIRO SIQUEIRA

CARACTERIZAÇÃO DAS INFECÇÕES POR NOROVÍRUS NAS HOSPITALIZAÇÕES PEDIÁTRICAS POR GASTRENTERITE NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ.

Dissertação apresentada à aprovação, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais pelo Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, pela Comissão formada pelos professores/pesquisadores:

Banca examinadora:

Yvone Benchimol Gabbay

Dr^a Yvone Benchimol Gabbay - Orientadora

Pesquisadora titular (U III) do Instituto Evandro Chagas

Maisa Silva de Sousa

Dr^a Maisa Silva de Sousa – Avaliadora

Professora adjunta do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA

Rosa Helena Porto Gusmão

Dr^a Rosa Helena Porto Gusmão – Avaliadora

Professora titular de pediatria da Universidade do Estado do Pará

Ana Cecília Ribeiro Cruz

Dr^a Ana Cecília Ribeiro Cruz – Avaliadora

Pesquisadora associada do Instituto Evandro Chagas

Luana da Silva Soares

Dr^a Luana da Silva Soares – Avaliadora suplente

Pesquisadora assistente do Instituto Evandro Chagas

Aprovado em: 20/10/2012

Conceito:

APROVADO

Belém – Pará

2012

Dedico esta obra aos meus pais, Vera e Mario, a quem dedico todas as vitórias de minha vida e sem os quais, nenhuma teria sentido.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, mãe, pai, irmãos, tias, tios, primas e primos, que sempre festejaram comigo as vitórias da minha vida.

À minha orientadora Dr^a Yvone Gabbay Mendes por todos os conhecimentos compartilhados, ensinamentos, confiança, incentivo e horas disponibilizadas. Obrigado pela oportunidade e satisfação em trabalhar sob sua orientação por todos esses quase 6 anos, por ter acreditado em meu potencial, mesmo eu não tendo muita experiência em laboratório de pesquisa quando comecei a atuar como seu estagiário. Obrigado pelo exemplo vívido de profissional apaixonada, ética, dedicada e acima de tudo humana e humilde, a quem sempre terei como referência em minha vida e carreira.

Ao Dr. Alexandre da Costa Linhares e toda equipe do Projeto Efetividade, pelos conselhos e por permitir o uso das amostras e dados provenientes deste projeto, o que ajudou muito no desenvolvimento do presente estudo.

A todos os amigos da Seção de Virologia do IEC, principalmente ao grupo de gastroenterites virais, em especial ao Darivaldo Neri, Luana Soares, Jane Kaiano e Patrícia Lobo.

Aos amigos de laboratório: Dielle Teixeira, Silvia Lucena, Juliana Hernandez, João Felipe e Maryelle Gonçalves, pela ajuda na bancada, preparação de reagentes, suporte informático e, sobretudo, pela amizade e bons momentos de convivência no laboratório.

Aos companheiros mais recentes no convívio do laboratório, porém não menos importantes, Sâmya Costa, Thayara Moraes, Tammy Amaral, Tallyta Barros, Evandro Rodrigues, Luciana Damascena e Túlio Fumian pela prazerosa convivência e certeza de amizade cada vez maior, o que já é facilmente observado.

Às amigas Glicélia Aragão e Paula Spada não só pela amizade e convivência diária, mas, sobretudo, por terem compartilhado comigo essa experiência, cheia de dúvidas, descobertas e dificuldades. Tenho certeza que crescemos juntos ao longo destes dois anos e posso dizer que foi um grande prazer tê-las ao meu lado.

Aos queridos amigos Ian Lima, Sylvia Guerra e Alessilva do Socorro pelo apoio profissional, conselhos, advertências, momentos de descontração sempre constantes e, especialmente, pela preciosa amizade.

Um agradecimento mais que especial a Thaís Carvalho, amiga na vida pessoal e a qual tive o prazer de conviver dentro do laboratório, onde trabalhou comigo intensamente neste projeto. Sem sua ajuda não seria possível terminar meus testes laboratoriais com tanta antecedência e nem me dedicar a outras atividades no laboratório. Muito obrigado.

Às colegas, Milla Santos, Luana Soares e Luana Barbagelatta pela ajuda na montagem e execução do aparelho de sequenciamento nucleotídico muito utilizado neste trabalho.

Aos amigos Túlio Fumian e Darleise Oliveira pela ajuda na análise dos cromatogramas e criação dos dendogramas.

Às colegas Anna Alice Nunes e Milene Silveira pelo apoio na realização do gráfico de Controle de Séries Temporais.

Ao Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (UFPA) pelo curso de pós-graduação que me permitiu obter o grau de mestre em Doenças Tropicais.

Ao Instituto Evandro Chagas (IEC) por todos os recursos humanos e materiais disponibilizados, os quais foram imprescindíveis para a realização deste e de outros projetos anteriormente conduzidos por mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro fundamental para que pudesse desenvolver esse trabalho integralmente.

Ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) por ter gentilmente disponibilizado os dados climáticos utilizados neste estudo.

Ao corpo técnico da biblioteca do IEC pelo auxílio na busca de periódicos.

À dona Valdenira de Jesus Moreira, bibliotecária do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, pela ajuda na construção da ficha catalográfica deste trabalho.

Ao professor Esmaelino Neves de Farias por ter gentilmente realizado a revisão ortográfica do referencial teórico desta dissertação.

À dona Graça Santos da Assessoria de Comunicação (ASCOM) do IEC, pelo auxílio na montagem do gráfico de sazonalidade relacionado aos dados climáticos e pela construção dos inúmeros pôsteres enviados a eventos científicos.

Às pesquisadoras Maisa Silva de Sousa, Rosa Helena Porto Gusmão, Ana Cecília Ribeiro Cruz e Luana da Silva Soares por aceitarem participar da banca examinadora desta dissertação de mestrado, tendo muito contribuído para o aperfeiçoamento da mesma.

Por fim, a todos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do trabalho aqui apresentado, meus sinceros agradecimentos.

“...caminante no hay camino, se hace camino al andar...”.

António Machado

Às vezes, quando considero as tremendas consequências advindas das pequenas coisas ... sou tentado a pensar ... não existem pequenas coisas.

Bruce Barton

Resumo

O *Norovirus* (NoVs), pertencente a família *Caliciviridae*, ocasiona quadro de gastroenterite aguda (GEA) em pessoas de todas as faixas etárias. Sua relevância como causa de surtos já está confirmada, os quais ocorrem principalmente em locais fechados. Sua transmissão é, sobretudo, pela via fecal-oral, por meio da ingestão de água/alimentos contaminados e contato pessoa-a-pessoa. A doença em geral se manifesta de forma súbita, caracterizada por diarreia, vômito, náusea e cólica abdominal. O objetivo deste estudo foi demonstrar a importância dos NoVs como patógenos associados às internações de crianças com quadro de GEA em Belém, Pará. A coleta dos espécimes fecais ocorreu de maio/2008 a abril/2011, sendo examinados somente aqueles com resultados negativos para rotavírus. Para a detecção dos NoVs foi utilizado o ensaio imunoenzimático (EIA) e a reação em cadeia mediada pela enzima polimerase e precedida de transcrição reversa (RT-PCR). As amostras com resultado positivo no EIA e negativo na RT-PCR foram submetidas a semi-nested RT-PCR, e aquelas que permaneceram negativas foram testadas pela PCR em tempo real. Foram analisadas 483 amostras, sendo observada uma positividade de 35,4% (171/483). Adotando-se a RT-PCR como o método de referência, o EIA apresentou sensibilidade de 85,9% e especificidade de 93,4%, com excelente reprodutibilidade entre ambas (Kappa= 0.8, $p < 0.0001$). As 22 amostras positivas apenas por EIA foram testadas pela semi-nested RT-PCR e PCR em tempo real, sendo observada positividade de 63,6% (14/22) e 75% (6/8), respectivamente. O sequenciamento nucleotídico parcial da região da ORF1 demonstrou a circulação dos genótipos GII.4d (80,8%-42/52), GII.7 (7,7%-4/52) e GII.b (11,5%-6/52). Foi realizado o sequenciamento de 64,3% (9/14) das amostras positivas somente pela semi-nested RT-PCR, também correspondente a ORF1, sendo 55,6% (5/9) classificadas como GII.4d e 44,4% (4/9) como GII.b. Das 6 amostras classificadas como GII.b, cinco foram caracterizadas como GII.3 quando sequenciadas com iniciadores específicos da região do capsídeo viral, sugerindo a possibilidade de se tratarem de amostras recombinantes. Foi observada maior taxa de infecção nas crianças menores de 2 anos de idade (90,1%-154/171) e os principais sintomas observados foram vômito (95,8%-137/143) e desidratação (94,4%-118/125), considerando que a diarreia foi critério de inclusão. A maioria das crianças infectadas apresentou mais de 9 dias de diarreia (41,2%), 4 evacuações diárias (43,9%) e mais de 5 episódios de vômito (90%) no período de internação. Com relação à sazonalidade, foram observados três picos de positividade, em setembro e outubro de 2008 (63,6%); e em fevereiro de 2010 (62,1%), não sendo notada nenhuma correlação com os parâmetros climáticos de pluviosidade, umidade e temperatura. Com este estudo, demonstrou-se a importância dos NoVs como enteropatógenos virais associados à GEA em crianças hospitalizadas em Belém, indicando a necessidade de uma vigilância ativa, a fim de evitar maior morbidade e possível mortalidade ocasionada por esse vírus na população infantil.

Palavras chave: Gastroenterite, norovírus, crianças, hospital.

Abstract

The *Norovirus* (NoVs), *Caliciviridae* family, is related with acute gastroenteritis (AGE) in people of all ages groups. Its importance as cause of outbreaks have been confirmed, which occur mainly indoors. Its transmission is mainly by the fecal-oral route through contaminated water and food, and person to person contact. The disease usually is characterized by diarrhea, vomiting, nausea and abdominal cramps. The aim of this study was to demonstrate the importance of NoVs as pathogen associated with hospital admissions of children with AGE in Belém, Pará. The collection of fecal specimens occurred from May 2008 to April 2011, being only tested the samples with negative results for rotavirus. The enzyme immunoassay (EIA) and the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used for NoVs detection. The samples with positive results by EIA and negative by RT-PCR, were submitted to the semi-nested RT-PCR, and the ones with remain negative, were tested by the real-time PCR. A total of 483 samples were analyzed with a positivity of 35.4% (171/483). Adopting the RT-PCR as the reference method, the EIA had a sensitivity of 85.9% and a specificity of 93.4% with excellent reproducibility between them ($\kappa = 0.8$, $p < 0.0001$). The 22 samples positive only by EIA were tested first by semi-nested RT-PCR and after by real-time PCR, with a positivity of 63.6% (14/22) and 75% (6/8), respectively. The partial nucleotide sequencing of ORF1 region demonstrated the presence of GII.4d (80.8%-42/52), GII.7 (7.7%-4/52) and GII.b (11.5%-6/52) genotypes. Sequencing was performed in 64.3% (9/14) of the samples positive only by semi-nested RT-PCR, also corresponding to ORF1, which 55.6% (5/9) were classified as GII.4d and 44.4% (4/9) as GII.b. Of the six samples classified as GII.b, five were characterized as GII.3 when sequenced with primers specifics for the capsid region, suggesting the possibility of recombinants samples. A higher infection rate was observed in children under 2 years of age (90.1%-154/171) and the main symptoms were vomiting (95.8%-137/143) and dehydration (94.4%-118/25), considering the diarrhea was an inclusion criterion. Most infected children had more than 9 days of diarrhea (41.2%), 4 evacuations per day (43.9%) and more than 5 episodes of vomiting (90%) during hospitalization. Regarding seasonality, three peaks of positivity were observed in September and October 2008 (63.6%), and in February 2010 (62.1%). Any correlation with the climatic parameters of rainfall, humidity and temperature was demonstrated. This study confirmed the importance of NoVs as viral enteropathogen associated with AGE among hospitalized children in Belém, imposing the necessity of an active surveillance, in order to avoid possible morbidity caused by this virus in childhood.

Key words: Gastroenteritis, norovirus, children, hospital.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 GASTREENTERITES	17
3.1.1 Gastreenterite viral	19
3.2 HISTÓRICO	20
3.3 CLASSIFICAÇÃO	22
3.3.1 Família <i>Caliciviridae</i>	22
3.3.2 Gênero <i>Norovirus</i>	24
3.4 ESTRUTURA MORFOLÓGICA, PROTÉICA E GENÔMICA	26
3.5 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E VIABILIDADE NO AMBIENTE	28
3.6 REPLICAÇÃO VIRAL	29
3.7 MODELOS DE INFECÇÃO <i>IN VITRO</i>	30
3.8 VARIABILIDADE E RECOMBINAÇÃO	31
3.9 PATOFISIOLOGIA DA INFECÇÃO VIRAL	35
3.10 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS	37
3.11 NOROVÍRUS E O GRUPO ABO	39
3.12 SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA	41
3.13 PERSISTÊNCIA DAS NOROVIROSES EM POPULAÇÕES HUMANAS	42
3.14 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	43
3.15 EPIDEMIOLOGIA	45
3.15.1 Epidemiologia no mundo	45
3.15.1.1 Surtos	45
3.15.1.2 Hospitalizações	46
3.15.2 Epidemiologia no Brasil	48
3.16 SAZONALIDADE	49
3.17 ASPECTOS CLÍNICOS	51
3.18 TRANSMISSÃO	53
3.18.1 Transmissão zoonótica	53
3.19 TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE	54
3.20 VACINA	56

4 OBJETIVOS	58
4.1 OBJETIVO GERAL	58
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	59
5.1 PACIENTES E ESPÉCIMES CLÍNICOS	59
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	60
5.3 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA	60
5.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	61
5.4.1 Ensaio imunoenzimático (EIA)	62
5.4.2 Suspensão fecal a 10%	63
5.4.3 Extração do RNA viral	63
5.4.4 Síntese do DNA complementar (cDNA)	64
5.4.5 Reação em cadeia da Polimerase (PCR Convencional)	65
5.4.6 Semi-nested RT-PCR	65
5.4.7 PCR em tempo real (<i>Real Time</i>)	68
5.4.8 Análise dos produtos amplificados	69
5.4.9 Sequenciamento parcial do genoma viral	70
5.4.9.1 Purificação do DNA	70
5.4.9.2 Reação de sequenciamento	71
5.4.9.3 Dendograma de similaridade	73
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
6 RESULTADOS	75
6.1 DETECÇÃO DE NOROVÍRUS	75
6.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS MÉTODOS DE DETECÇÃO (EIA E RT-PCR)	76
6.3 GENOTIPAGEM	77
6.4 DADOS CLÍNICOS	81
6.5 SAZONALIDADE	83
7 DISCUSSÃO	87
8 CONCLUSÕES	96
9 PERSPECTIVAS	97
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICES	
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

Aminoácidos	aa
Centros de Controle de Doenças e Prevenção dos EUA	CDC
DNA Complementar	cDNA
Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do Instituto Evandro Chagas	CEP/IEC
Cloreto de Césio	CsCl
Dimetil Sulfóxido	DMSO
Deoxinucleotídeos Trifosfato	DNTPs
Ácido Etileno Diamino Tetracético	EDTA
Ensaio Imuno-Enzimático	EIA
Estados Unidos	EUA
Genogrupo	G
Ácido Clorídrico	HCl
Calicivírus Humano	HuCVs
Instituto Evandro Chagas	IEC
Imuno-Microscopia Eletrônica	IME
Microscopia Eletrônica	ME
Cloreto de Magnésio	MgCl
Mistura	Mix
Hidróxido de Sódio	NaOH
Número Necessário para Causar um Evento Desfavorável	NNH
Norovírus	NoVs
Matriz de Leitura Aberta	ORF
Pares de Bases	pb
Quantidade Suficiente Para	q.s.p.
Gene que codifica a enzima RNA polimerase RNA dependente	RdRp
Rotavírus	RoVs
Rotações por Minuto	rpm
Reação em Cadeia mediada pela Polimerase e precedida de Transcrição Reversa	RT-PCR
Unidades	U
Unidade de Terapia Intensiva	UTI
Radiação Ultravioleta	UV
Vacina Oral contra Rotavírus Humano	VORH

1 INTRODUÇÃO

A gastroenterite, tanto epidêmica quanto esporádica, é uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre pessoas de todas as faixas etárias, sendo responsável, anualmente, por mais de 1,8 milhões de mortes de crianças menores de 5 anos de idade em todo o mundo (BRYCE et al., 2005). A causa da doença inclui uma ampla variedade de patógenos como bactérias, parasitas e vírus; contudo, em muitos locais, a relativa contribuição desses agentes é desconhecida. Estudos a respeito da doença raramente avaliam todos os agentes etiológicos possíveis e, mesmo naqueles que o fazem, aproximadamente 40-50% dos casos da doença permanecem sem uma definição etiológica (PATEL et al., 2009). Estratégias de prevenção e tratamento são necessárias para que haja redução nas taxas de incidência das diarreias graves causadas por diversos agentes (PATEL et al., 2008).

Dos principais enteropatógenos associados à gastroenterite, os vírus apresentam grande importância epidemiológica, dentre os quais se destacam os rotavírus (RoVs) do grupo A, calicivírus humanos (HuCVs) (gêneros *Norovirus* [NoVs] e *Sapovirus*), astrovírus humanos e adenovírus entéricos (tipos 40 e 41). Outros vírus menos conhecidos também estão relacionados a casos de gastroenterite tais como aichivírus, bocavírus, picobirnavírus, parechovírus humano, torovírus, coronavírus, pestivírus e enterovírus 22 (GLASS et al., 2001; WILHELMI et al., 2003; USHIJIMA, 2009). No entanto, quando considerados os surtos de diarreia em populações humanas, os NoVs assumem maior importância (CASTILHO et al., 2006).

O NoVs é categorizado como um patógeno de categoria B pelo *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*, agência federal dos Estados Unidos (EUA) que promove pesquisa médica e investiga as causas e tratamentos para doenças comuns e raras, classificando os patógenos em categorias A, B ou C (em ordem decrescente de importância) conforme a necessidade de biodefesa contra eles (NIAID, 2007).

Esse vírus merece essa classificação devido a sua importante capacidade de provocar surtos de gastroenterite em populações expostas, especialmente em locais fechados como restaurantes, asilos, hospitais, acampamentos militares, navios, dentre outros. A ocorrência desses surtos pode assumir grandes proporções afetando centenas de pessoas e exigindo atendimento médico imediato e medidas de contenção da doença, como fechamento de estabelecimentos e descontaminação ambiental, o que nem sempre é de fácil procedimento. O NoVs é de interesse para pediatras por causar gastroenterite aguda grave em crianças, estando relacionado não raramente a surtos nosocomiais e em creches (MATSON E SZÜCS, 2003).

Estudos empregando métodos moleculares de diagnóstico têm demonstrado que o NoVs é responsável por >90% dos surtos de gastroenterite não-bacteriana e ≈50% de todas as causas de gastroenterite epidêmica ocorridas no mundo (WIDDOWSON et al., 2005). Dados recentes sugerem que o impacto do NoVs é muito maior do que se previa antigamente, especialmente em pesquisas realizadas antes da década de 90, em que as técnicas de identificação (microscopia eletrônica [ME] e ensaios imunoenzimáticos [EIA]) eram restritas e pouco sensíveis, subestimando a verdadeira taxa de infecção desse agente na população (GLASS et al., 2000; AMAR et al., 2007).

Apesar da prevalência global desse vírus, seu impacto econômico permanece desconhecido, sendo que o uso generalizado de métodos diagnósticos mais sensíveis poderá melhorar a vigilância e controle deste patógeno (LOPMAN, 2006; PATEL et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Estudos estimam que, anualmente, os NoVs sejam responsáveis por ≈ 900.000 episódios de gastroenterite que requerem visita clínica e ≈ 64.000 hospitalizações de crianças menores de 5 anos de idade, em países economicamente desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento, a situação é mais alarmante. Acredita-se que ocorram mais de 1,1 milhões de hospitalizações e 128.000 mortes por ano (PATEL et al., 2008).

Em todo o mundo, estudos de prevalência demonstram a presença desse agente infectando as mais diversas populações. No Brasil, os dados sobre a circulação do NoVs ainda são escassos, especialmente em pacientes hospitalizados ou vítimas de surtos, podendo-se citar alguns estudos realizados no Distrito Federal, Pará, Rio de Janeiro, Espírito Santo e em São Paulo, dentre outros, com positivities que variam de 1,9% a 39,7% (BORGES et al., 2006; CASTILHO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2008; VICTORIA et al., 2007; ARAGÃO et al., 2010).

A possibilidade de aplicação da técnica de reação em cadeia mediada pela enzima polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR), no início da década de 1990, facilitou o diagnóstico do NoVs e permitiu um avanço considerável na pesquisa deste agente. Ressalta-se que já é bem definida a importância deste vírus como responsável por ocasionar gastroenterite grave em pessoas de todas as faixas etárias, bem como sua associação com surtos (MEAD et al., 1999).

Contudo, tem sido observado um aumento nas taxas de detecção deste agente (por exemplo, de 12,5% em 1990-1991 para 44,4% em 2010, nas cidades de Fortaleza e Belém, respectivamente) (PARKS et al., 1999; SIQUEIRA, et al., 2010a). Este aumento pode estar relacionado à melhora dos métodos diagnósticos ou à possibilidade de as norovirose serem uma doença emergente na atualidade. Recentes pesquisas discutem se novas linhagens de

NoVs podem periodicamente emergir em nível local ou global, aumentando assim a incidência da doença (HALE et al., 2000; NOEL et al., 1999).

Entretanto, um estudo de revisão sistemática que avaliou pesquisas conduzidas em diferentes localidades por um período de 18 anos, demonstrou que 75% dos casos de gastroenterite associados ao NoVs foram ocasionados por cepas pertencentes ao genogrupo (G) II, genótipo 4 (PATEL et al., 2008). Não está totalmente esclarecido o porquê desta linhagem ser a mais prevalente em todo o planeta, como também, se está relacionada a uma maior gravidade do quadro clínico, maior facilidade de escapar da resposta imune do hospedeiro e/ou maior transmissibilidade (WIDDOWSON et al., 2005). Assim sendo, pesquisas que visem definir a variabilidade genotípica deste agente, nas mais diversas localidades do globo, são importantes para estabelecer um panorama epidemiológico-molecular deste vírus, que pode embasar estudos futuros que visem à concepção de uma vacina.

O aumento nas taxas de detecção do NoVs em diversas localidades e o grande prejuízo econômico causado pelo mesmo, tornam-no um problema de saúde pública, requerendo maiores esforços da comunidade científica mundial para melhorar as medidas de tratamento/prevenção e a vigilância desse agente. No entanto, as particularidades de cada região devem ser levadas em consideração, uma vez que nem sempre procedimentos previamente estabelecidos de logística hospitalar/ambulatorial e laboratorial podem ser aplicados em todas as localidades do mundo, mesmo que sejam de fácil execução.

Diante deste panorama, é de fundamental importância a melhor caracterização desse vírus a fim de esclarecer seus aspectos epidemiológicos e moleculares, especialmente na Amazônia, onde em virtude das peculiaridades ambientais da região, muitos dados de sazonalidade e clima não se aplicam ao resto do mundo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 GASTRENTERITES

Gastrenterite é um termo usado para definir a inflamação do trato gastrintestinal, inespecífico quanto aos possíveis agentes etiológicos envolvidos. Corresponde a vários estados patológicos do estômago e intestino, cuja principal manifestação é a diarreia, que pode ser associada a náuseas, vômitos e dor abdominal. Não existe um conceito universal de diarreia e muitas definições sobre a frequência, consistência e teor de água das fezes são relatados por diferentes autores, contudo, simplificadamente, a diarreia pode ser caracterizada como fezes que tomam a forma do recipiente em que estão armazenadas (DISKIN, 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a diarreia consiste em três ou mais evacuações líquidas ou semilíquidas por um período de 24 horas, ou mais evacuações do que o habitual diário para cada indivíduo (WHO, 2011).

Fisiologicamente, a diarreia de natureza osmótica é um tipo de fisiopatologia de diarreia aguda, que compreende um movimento alterado de íons e água que segue uma diferença de gradiente eletroquímico. Sob condições normais, o trato gastrintestinal tem grande capacidade de absorver líquidos e eletrólitos. O intestino recebe diariamente 8-9 litros de fluidos, contudo, somente 100-200 ml são excretados nas fezes. Quando patógenos entéricos acometem o organismo, pode haver alteração no balanço iônico e líquido, podendo gerar doença diarreica (HODGES E GILL, 2010).

Essa doença pode rapidamente atingir proporções de uma epidemia dependendo do enteropatógeno causativo, gerando superlotação dos sistemas de saúde pública, mesmo nas sociedades economicamente favorecidas. Quando transmitida por água e alimentos contaminados que resultam em surtos em embarcações e aeronaves, sua identificação passa a ser de notificação compulsória conforme preconiza a Portaria nº 104 de 25 de janeiro de 2011 do Ministério da Saúde, que define as terminologias adotadas em legislação nacional com

relação a doenças, agravos e eventos em saúde pública em todo o território nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde (BRASIL, 2011).

Trata-se de um problema de saúde pública de preocupação mundial. Informações precisas sobre esta enfermidade em nível global são subestimadas, especialmente nos países em desenvolvimento socioeconômico, nos quais se verifica constante inobservância na obrigatoriedade da notificação desta doença e a insuficiência de dados nas declarações de óbito quanto à causa básica (OLIVEIRA et al., 1998).

Estima-se que ocorram anualmente cerca de 2>4 bilhões de episódios de diarreia, apresentando 4>6 milhões de óbitos em crianças, sendo os lactentes no primeiro ano de vida o principal grupo de risco, tanto no que diz respeito à incidência, como no risco para complicações e morte (ALMEIDA et al., 1998; CLARK E MCKENDRICK, 2004; HODGES E GILL, 2010). A prevalência da doença varia com diversos fatores, tais como a condição socioeconômica, a localização geográfica, a faixa etária da população estudada e as estações do ano (ALMEIDA et al., 1998). Essa frequência também varia de acordo com o enteropatógeno responsável (bactéria [51%], vírus [40%], *Giardia lamblia* [7-15%], *Cryptosporidium parvum* [7%]). Em países de baixa renda, as condições socioeconômicas da população favorecem a ocorrência de desnutrição infantil, o que se constitui um fator de agravamento para os episódios de gastroenterite (LEE E GREIG, 2010; TERLETSKAIA-LADWIG et al., 2011).

Estimativas sobre mortalidade infantil em 193 países demonstraram que 68% das mortes de crianças menores de 5 anos de idade foram causadas por doenças infecciosas, sendo 15% em decorrência de diarreia. No Brasil, 5,3% das mortes de crianças nessa faixa etária estão associadas a essa enfermidade (BLACK et al., 2010).

No estado do Pará, os casos de diarreia são mais registrados em crianças com idade menor de 1 ano (média de 20 para 100 nascidos vivos); e é nesta faixa etária que se observa o maior número de internações, o maior coeficiente de letalidade hospitalar (2,1 óbitos em cada 100 internações) e o maior coeficiente de mortalidade infantil (0,7 óbitos para 1000 nascidos vivos) em decorrência de gastroenterite. Acredita-se que esses dados sejam subestimados devido ao registro ineficiente das informações, especialmente em virtude da falta de notificação dos casos e da banalização que as doenças diarreicas assumem entre a população e os profissionais de saúde em geral (DIAS et al., 2010).

3.1.1 Gastroenterite viral

Vários enteropatógenos virais estão associados à gastroenterite que acomete pessoas de todas as idades, dentre os quais podemos citar como principais, os RoVs, NoVs, astrovírus humano e adenovírus entérico (OLIVEIRA et al., 1998).

Os RoVs são responsáveis por 2 milhões de hospitalizações e 600-875 mil mortes por ano, apresentando infecção mais grave em crianças menores de 5 anos residentes em países em desenvolvimento. A maioria das infecções é ocasionada pelos RoVs do grupo A, porém os grupos B e C também podem causar diarreia em humanos. Os NoVs assumem maior importância quando considerados surtos de gastroenterite não-bacteriana, sendo responsáveis por >90% dos mesmos. Os astrovírus possuem um gênero que acomete o homem (*Mamastrovírus*), o qual se subdivide em 8 sorotipos, sendo o tipo 1 o mais prevalente em todo o mundo. Já os adenovírus apresentam até 51 sorotipos e seis subgêneros que infectam seres humanos; contudo, os principais relacionados a quadros de gastroenterite são os sorotipos 40 e 41, membros da família F (considerados fastidiosos), que estão associados a até 15% das diarreias (CLARK E MCKENDRICK, 2004).

3.2 HISTÓRICO

Nas décadas de 1940 e 1950, e principalmente a partir dos anos 1970, iniciou-se, no campo da virologia, a procura por um agente infeccioso que pudesse estar implicado nos casos de gastroenterite, dos quais a etiologia bacteriana havia sido excluída. A doença então chamada de “síndrome” era caracterizada por um conjunto de sinais/sintomas clínicos que envolviam vômito, diarreia e dores abdominais que podiam se manifestar isoladamente ou em conjunto. Esta enfermidade acometia uma grande parte da população e estudos envolvendo famílias demonstraram que, por um período de 10 anos, esta foi a segunda mais frequente moléstia. Desde a década de 1940, tentativas de cultivar e caracterizar *in vitro* o patógeno responsável pela doença foram realizadas em células de vários animais, incluindo macacos, contudo sem sucesso (KAPIKIAN, 2000).

Em 1971, Kapikian et al. (1972) utilizaram um filtrado proveniente de uma amostra de swab retal pertencente a um adulto acometido por diarreia durante um surto ocorrido em uma escola primária na cidade de Norwalk, Ohio, EUA, para infectar voluntários via oral. Dos 3 voluntários inoculados, dois apresentaram sintomas típicos da síndrome, os quais persistiram mesmo após duas inoculações seriadas. Estudos de caracterização revelaram que o agente causador possuía menos de 36 nm de diâmetro e era resistente a éter, ácido e aquecimento a 60°C por 30 minutos.

Na tentativa de se identificar esse patógeno, foi empregada a técnica de Imuno-microscopia eletrônica (IME), utilizando fezes e soro de um desses voluntários, em que foi observado um agregado de partículas não envelopadas com cerca de 27 nm de diâmetro similares aos rinovírus (figura 1) (KAPIKIAN, 2000).

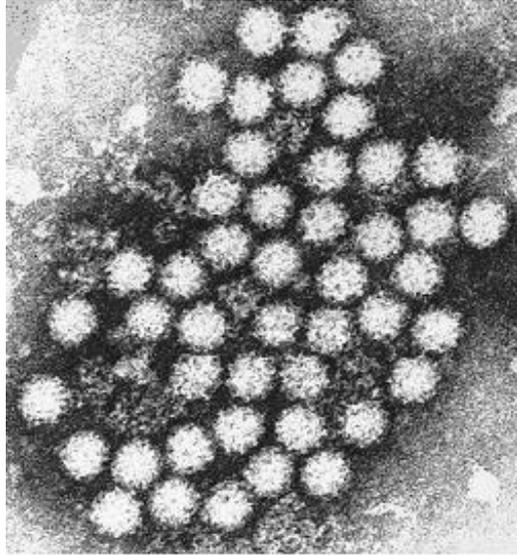


Figura 1. Aglomerado de partículas de norovírus observado, pela primeira vez por IME, no estudo realizado por Kapikian et al. (1972), a partir de filtrado fecal de amostra de voluntário.

Desta forma, foi então identificado o fastidioso patógeno responsável pela síndrome que acometia, e ainda hoje acomete, grande parte da população mundial, denominado inicialmente de agente de Norwalk devido ao local onde ocorreu o surto. Amostras coletadas em outras localidades e que apresentavam as mesmas características quando visualizadas à IME eram denominadas de *Norwalk like virus* ou nomeadas com o nome do local de detecção. Genericamente, eram chamados de pequenos vírus de estrutura arredondada (*Small Round Structure Virus*) (KAPIKIAN et al., 1972).

Apesar de terem sido descobertos oficialmente em 1972, o conhecimento acerca desse patógeno ficou muito limitado em virtude de o mesmo não se propagar em cultura de células e não existir, até então, um modelo animal eficiente para os estudos. Em 1990, Jiang e colaboradores realizaram os primeiros estudos envolvendo técnicas mais avançadas como a clonagem do genoma viral. Foram construídas bibliotecas de cDNA a partir da extração do ácido nucléico de vírions, provenientes de amostras de fezes de voluntários, que após clonadas, permitiram saber que o vírus possui genoma de RNA de fita simples, senso positivo, poliadenilado na extremidade 3'end, com cerca de 7,5 kilobases (kb) e com uma enzima polimerase RNA dependente (RdRp).

Ainda no início da década de 1990, Jiang et al. (1992) produziram a proteína do capsídeo utilizando um sistema de tradução em células livre e baculovírus recombinantes. Os produtos expressos demonstraram que foi possível produzir artificialmente proteínas similares, em tamanho e aparência, àquelas vistas nos NoVs nativos, cuja antigenicidade foi testada por imunoprecipitação e EIA. Este estudo foi de grande importância para a pesquisa dos NoVs, pois permitiu trabalhar com um grande número de partículas virais recombinantes, possibilitando o desenvolvimento de testes seguros, rápidos e sensíveis. Pode ser considerado um marco na pesquisa deste patógeno, pois iniciou os estudos do genoma viral em nível estrutural.

Em 1993, ainda Jiang e colaboradores fizeram mais uma importante contribuição para a pesquisa dos NoVs. Dando continuidade ao estudo de clonagem desenvolvido em 1990, foi realizada sua completa caracterização molecular, que permitiu saber que o vírus é composto por um genoma com 7642 nucleotídeos (excluindo sequências de cauda poli-A), apresenta cerca de 48% de bases G+C e é dividido em 3 matrizes de leitura. Com o conhecimento mais detalhado da organização genômica deste patógeno, somado aos aspectos morfológicos, de tamanho e polaridade, foi então possível observar que o mesmo se assemelhava muito a outros dois calicivírus de interesse veterinário, indicando que os então chamados Norwalk vírus, pertenciam a esta família, o que foi posteriormente aceito pela comunidade acadêmica.

3.3 CLASSIFICAÇÃO

3.3.1 Família *Caliciviridae*

A família *Caliciviridae* apresenta cinco gêneros, dois importantes na saúde humana (*Norovirus* e *Sapovirus*) e três de interesse veterinário (*Lagovirus*, *Vesivirus* e *Nebovirus*) cada um representando um distinto clado genético dentro da família. Embora a maioria dos estudos diagnósticos tenham sido concebidos visando a detecção dos NoVs, o que

provavelmente levou a uma subvalorização da relevância dos sapovírus, é inegável a importância epidemiológica dos NoVs como o principal membro dos HuCVs nos quadros de diarreia grave (MATSON E SZÜCS, 2003; CLARK et al., 2012).

Em cada gênero, uma ou mais espécies têm sido definidas baseadas em relações genéticas. Abaixo do nível de espécie, sistemas de tipagem genética provisória determinam os genogrupos, que são divididos em genótipos (GREEN, 2007). O *Nebovirus*, gênero não patogênico aos humanos, foi incluído recentemente na família (CARSTENS, 2010). Estudos sugerem a introdução de outros potenciais gêneros como os Tulane vírus detectados em macacos reshus, Bavaria vírus encontrados em frangos e os Valovírus em porcos adultos, contudo, os mesmos ainda não foram reconhecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia em Viroses (FARKAS et al., 2008; L'HOMME et al., 2009; WOLF et al., 2011). O quadro 1 apresenta a estrutura taxonômica dos gêneros de calicivírus.

Gênero	Vírus representativo	Linhagem representativa
<i>Norovirus</i>	Norwalk virus	Hu/NoV/GI.1/Norwalk/1968/US
<i>Sapovirus</i>	Sapporo virus	Hu/SaV/GI.1/Sapporo/1982/JP
<i>Lagovirus</i>	Vírus da doença hemorrágica de coelhos	Ra/LaV/RHDV/GH/1988/DE
	Vírus da síndrome da lebre marrom europeia	Ha/LaV/EBHSV/GD/1989/FR
<i>Vesivirus</i>	Vírus do exantema vesicular de suínos	Sw/VeV/VESV/A48/1948/US
	Calicivírus felino	Fe/VeV/FCV/F9/1958/US
<i>Nebovirus</i>	Newbury-1 virus	Bo/Newbury1/1976/UK

Quadro 1. Estrutura taxonômica dos calicivírus. Os criptogramas que simbolizam as linhagens representativas são organizados da seguinte maneira: Hospedeiro de onde o vírus foi obtido / Gênero / Vírus representativo ou Genogrupo / Nome da linhagem / Ano de ocorrência / País de origem. Quadro adaptado de Oliver et al. (2006) e Green et al. (2007).

3.3.2 Gênero *Norovirus*

Não há consenso acerca de critérios para a padronização da classificação genotípica do NoVs. É estabelecido que existam 5 genogrupos dentro do gênero (GI, GII, GIII, GIV e GV), no entanto, poucos estudos filogenéticos consideram a sequência genômica completa do capsídeo e raros incluem sequências dos 5 genogrupos na determinação dos genótipos (GREEN et al., 2000) (figura 2).

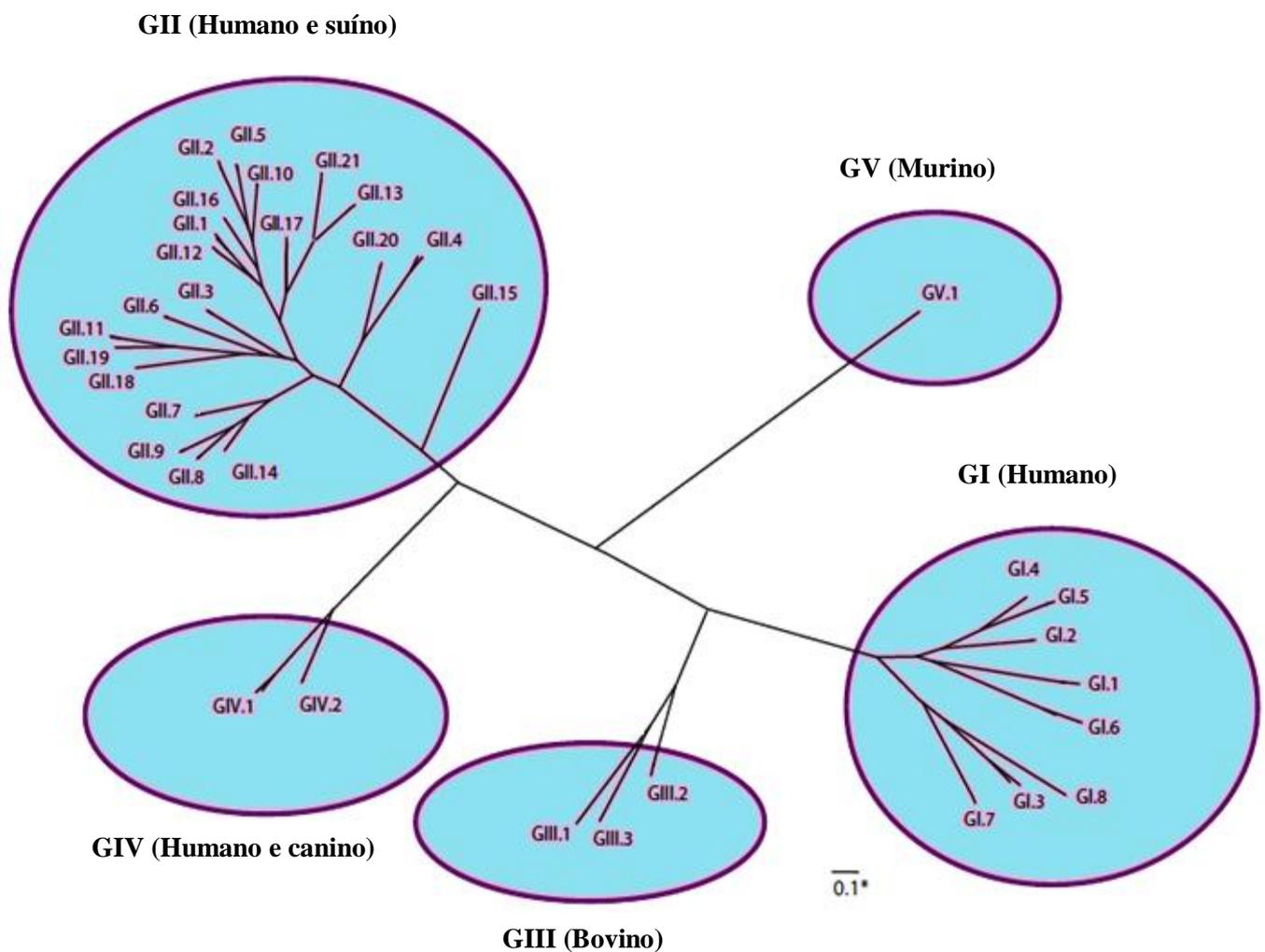


Figura 2. Classificação dos norovírus em 5 genogrupos (GI-GV) e 35 genótipos baseados na diversidade genética da proteína completa do capsídeo (VP1). Árvore filogenética adaptada do CDC (2011).

Com o objetivo de simplificar e de certo modo uniformizar os difíceis critérios de classificação dos NoVs, Zheng et al. (2006) propuseram uma nova classificação da nomenclatura deste gênero, baseada em um esquema filogenético bem definido, envolvendo a análise de linhagens por múltiplos métodos de cálculo de distância e avaliação das sequências genômicas da proteína do capsídeo dos 5 genogrupos aceitos, determinando 29 genótipos circulantes. Contudo, dados mais recentes publicados pelos Centros de Controle de Doenças e Prevenção dos EUA apresentam outra classificação genotípica (quadro 2).

Genogrupo	Hospedeiro	Genótipos	Nº de Genótipos
GI	Humano	1-8	8
GII	Humano	1-10, 12-17, 20, 21	21
	Suíno	11, 18, 19	
GIII	Bovino	1-3	3
GIV	Humano	1	2
	Canino	2	
GV	Murino	1	1
Total	5		35

Quadro 2. Genogrupos e genótipos pertencentes ao gênero *Norovirus*. Quadro adaptado do CDC (2011).

Em contrapartida, Phan et al. (2007) propuseram uma nova nomenclatura baseada na análise genética do domínio S e N-terminal de sequências do gene do capsídeo de linhagens de referência caracterizadas ao redor do mundo e disponíveis no *GenBank*. Nesta classificação, os autores dividem o NoVs em sete genogrupos (GI-GVII), sendo GI, GIV, GVI e GVII encontrados exclusivamente em humanos, GII incluindo cepas humana e suína, GIII encontrado apenas em bovinos e GV em murinos.

Outros estudos sugerem a presença de mais 3 genótipos: um em GII, que além de humanos e suínos, também infectaria bovinos assim como o GIII; outro genótipo em GIII que

estaria relacionado à infecção em ovelhas; e um terceiro em GIV que foi descrito infectando um leão (MARTELLA et al., 2007; MATTISON et al., 2007; WOLF et al., 2009).

3.4 ESTRUTURA MORFOLÓGICA, PROTÉICA E GENÔMICA

Os calicivírus possuem capsídeo icosaédrico composto por múltiplas cópias da maior proteína estrutural. Cerca de 180 moléculas da proteína do capsídeo são codificadas pela segunda matriz de leitura aberta do genoma e organizadas em 90 capsômeros diméricos que formam 32 depressões em forma de cálice. É composto por duas proteínas estruturais (VP1 [proteína maior] e VP2 [proteína menor]), na qual a VP1 assume maior importância, levando muitos autores a considerar a presença de apenas uma proteína estrutural nos NoVs. Capsídeo composto por uma única proteína estrutural é característica comum aos vírus que infectam plantas, porém raro nos que infectam animais. Além dos calicivírus, o único exemplo conhecido é a família *Nodaviridae* que infecta insetos (HOSUR et al., 1987). Assim sendo, os determinantes funcionais da integridade estrutural, imunogenicidade e infectividade são definidos a partir dessa única proteína. Dessa maneira, os calicivírus possuem todas as características dos vírus que infectam animais, contudo, têm a simplicidade estrutural daqueles que infectam plantas, tornando-se únicos dentre os vírus (PRASAD et al., 2000).

O NoVs é caracterizado como um vírus de RNA fita simples, senso-positivo, não envelopado, medindo de 27 a 40 nm de diâmetro e com 7,5 kb. Apresentam superfície externa de aspecto rugoso e com espículas pouco pronunciadas (GREEN et al., 2007).

Seu genoma contém três matrizes de leitura aberta (ORF): ORF 1, ORF 2 e ORF 3 (figura 3). A ORF 1 codifica uma poliproteína não estrutural de 1738 aminoácidos (aa) que pode ser clivada em 6 proteínas, incluindo a RdRp. A ORF 2 codifica a VP1 de 530 a 555 aa e que possui dois domínios: S e P. O domínio S contém elementos essenciais para a formação do icosaédro. O domínio P está dividido em dois subdomínios: P1 e P2, os quais interagem

em contatos diméricos aumentando a estabilidade do capsídeo e formando as protruções no vírion. A ORF 3 codifica a proteína menor do capsídeo (VP2) de 208 a 268 aa que atua na encapsidação do RNA genômico e na estabilização dos blocos capsídicos da VP1 para produzir partículas que sejam resistentes à degradação proteolítica (ATMAR E ESTES, 2001; HARDY, 2005).

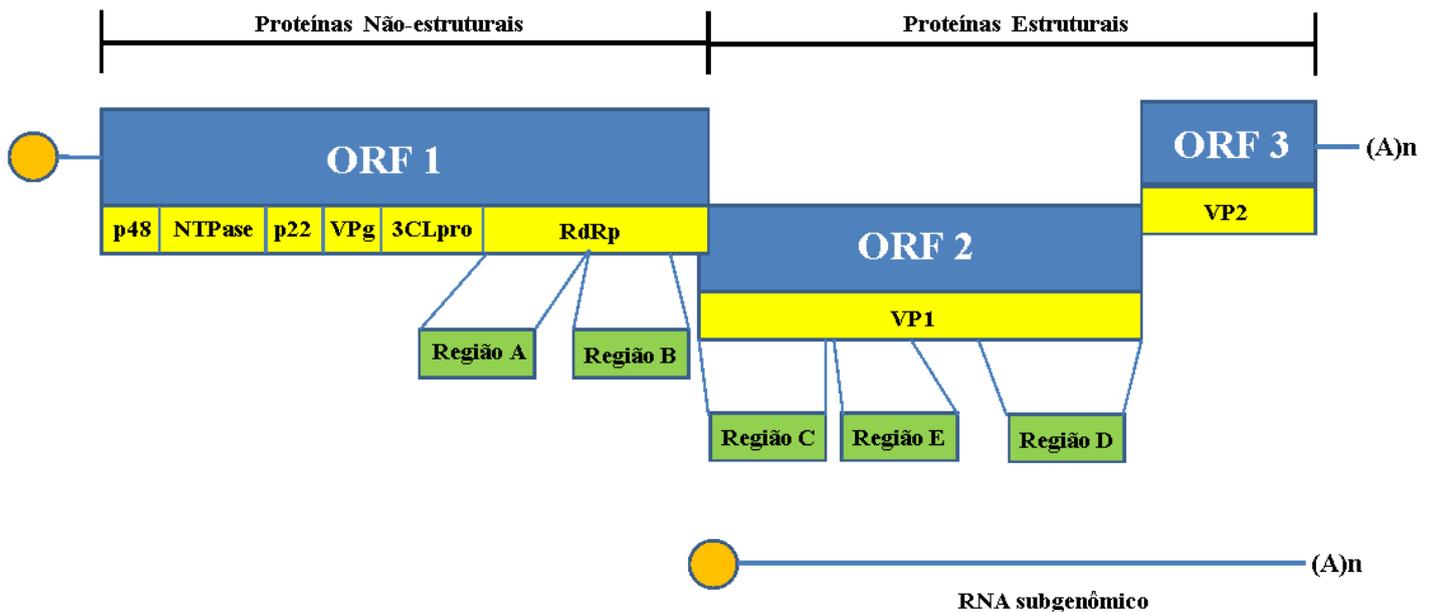


Figura 3. Organização genômica e protéica dos norovírus baseada na linhagem representativa (Hu/NoV/GI.1/Norwalk/1968/US), código M87661 de acesso no GenBank. Faixa amarela corresponde à região do genoma que codifica as proteínas. p48: Proteína p48; NTPase: Proteína Nucleosídeo Trifosfatase; p22: Proteína p22; VPg: Proteína de união ao genoma; 3CLpro: Proteinase; RdRp: Polimerase; VP1: Proteína principal do capsídeo; VP2: Proteína menor do capsídeo. Faixa azul: apresenta as matrizes de leitura aberta. Círculo laranja: Proteína VPg. (A)n: Cauda Poli (A). Esquema adaptado de Vinjé et al. (2004), Hardy (2005), Green et al. (2007) e Siebenga et al. (2009).

Os diversos estudos de filogenia realizados com o NoVs concentraram-se nas regiões da RdRp e da proteína do capsídeo. As regiões A e B (partes do gene da RdRp localizado na ORF1) compreendem a região mais conservada do genoma viral, sendo portanto, mais adequada para a detecção dos NoVs (JIANG et al., 1999; FANKHAUSER et al., 2002). As

regiões C (uma pequena extensão da região 5'end da ORF2) e D (região 3'end da ORF2) codificam parcialmente a proteína VP1 do capsídeo e são mais indicadas para a caracterização molecular de diferentes genótipos, sendo a região D a mais recomendada para a caracterização de variantes GII.4 e utilizada como uma alternativa eficiente ao sequenciamento completo da VP1 que apresenta cerca de 1600 nucleotídeos (VINJÉ et al., 2004; MATTISON et al., 2009; SIEBENGA et al., 2009). Existe ainda a região E localizada entre as regiões C e D.

3.5 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E VIABILIDADE NO AMBIENTE

A densidade de sedimentação dos NoVs em CsCl é de 1,33 a 1,41 g/cm³. Os vírions preservam sua infectividade ao serem expostos a agentes físico-químicos como soluções cloradas (concentrações de 3,75 a 6,25 mg/L), após tratamento com éter a 20%, ao calor de até 60°C por 30 minutos ou a baixas temperaturas. Também são resistentes a pH ácido. No entanto, concentrações de cloro superiores a 10 mg/L são capazes de inativar esses agentes, bem como a exposição a etanol a 70% por 30 minutos (DUIZER et al., 2004a; GREEN et al., 2007).

O fato dos NoVs humanos serem incultiváveis em sistema de cultura celular rotineiramente utilizados nos laboratórios, dificulta a realização de estudos que estimem a infectividade destes vírus no ambiente, contudo, algumas pesquisas envolvendo possíveis substitutos aos NoVs permitem mensurar a viabilidade da partícula viral fora do hospedeiro (MARSHALL E BRUGGINK, 2011).

Doultree e colaboradores (1999) utilizaram os calicivírus de felinos como substitutos aos NoVs humanos em um estudo que verificou a sobrevivência deste patógeno a uma variedade de condições ambientais. Foi observado que esse vírus sobreviveu por até 60 dias a

4°C (com perda mínima de infectividade) e permaneceu estável à temperatura ambiente por 14 a 21 dias quando suspensos em meio de cultura e 21 a 28 dias, em ambiente seco.

Bae e Schwab (2008) compararam a sobrevivência dos calicivírus de felinos com o NoVs murino em água, e concluíram que o último apresentou maiores taxas de sobrevivência, com menos perda de infectividade e de integridade do ácido nucléico a 25°C. Outro estudo conduzido por Lamhoujeb e colaboradores (2009) verificou a infectividade dos NoVs em superfícies de materiais que comumente entram em contato com alimentos, como aço inoxidável (usado na fabricação de talheres) e policloreto de polivinila, conhecido por PVC (usado em recipientes que armazenam alimentos). Neste estudo, foi observado que os NoVs humanos permanecem infecciosos nestas superfícies por até 28 dias a 20°C.

3.6 REPLICAÇÃO VIRAL

Os calicivírus compartilham muitas estratégias de replicação observadas em outros vírus de polaridade positiva. Primeiramente, o vírus interage com a célula do hospedeiro via receptor vírus-específico, permitindo a entrada da partícula no citoplasma da célula. Posteriormente, o RNA genômico do vírus é liberado e ocorrem interações com a célula que, até o momento são pouco conhecidas. O início da tradução é mediada pela proteína VPg e ocorre pela interação do genoma viral com os mecanismos de tradução celular. A ORF 1 é traduzida para produzir a poliproteína não estrutural. O início da síntese de uma fita simples de RNA antisense, a partir do *template*, ocorre envolvendo interações com as proteínas celulares. Da mesma forma que todos os outros vírus de RNA senso-positivos, a replicação está associada com as membranas da célula do hospedeiro. Os mecanismos de empacotamento do RNA viral, maturação e liberação celular são pouco compreendidos, contudo, a apoptose celular pode facilitar a liberação dos vírus (GREEN et al., 2007).

3.7 MODELOS DE INFECÇÃO *IN VITRO*

O tropismo celular dos NoVs humanos ainda é desconhecido. Diversas tentativas de se identificar um sistema de cultura eficaz para este patógeno já foram feitas, porém sem sucesso. A inabilidade destes vírus em se propagarem em meios de cultivo artificiais é o maior obstáculo para estudá-los (DUIZER et al., 2004b; KARST, 2010). Biópsias intestinais de voluntários infectados com NoVs GI.1 e GII.1 demonstraram pela ME, não haver presença de partículas virais neste tipo de material (AGUS et al., 1973; DOLIN et al., 1975). Contudo, recentes estudos em modelos animais sugerem que múltiplos tipos de células intestinais, incluindo enterócitos, macrófagos e células dendríticas podem apresentar, mesmo que em baixo nível, alguma replicação *in vitro* (KARST, 2010).

Na literatura, já foi reportada a infecção de NoVs em um modelo tridimensional do epitélio intestinal humano, contudo com resultados questionáveis (STRAUB et al., 2007). Pesquisas demonstram a infecção de suínos e bezerros gnotobióticos pela linhagem HS66, pertencente ao NoVs GII.4. Esses animais desenvolveram diarreia e os bezerros apresentaram mudanças histopatológicas evidentes. Nos suínos, observaram-se partículas virais e capsídeo viral nas vesículas citoplasmáticas dos enterócitos localizados na extremidade apical e ao longo das vilosidades, porém ausentes nas criptas do duodeno e jejuno (CHEETHAM et al., 2006; SOUZA et al., 2008).

O NoVs que infecta murino vem sendo alvo de muitas pesquisas envolvendo o cultivo celular deste patógeno. Por ser naturalmente entérico, é muito útil neste campo de pesquisa, haja vista ser oralmente infeccioso, podendo ser encontrado na mucosa do intestino e nos nódulos linfáticos mesentéricos durante a infecção, bem como ser expelido pelas fezes, o que permite seu isolamento. É conhecido por se replicar em células dendríticas e macrófagos derivados de monócitos isolados de células mononucleares do sangue periférico, porém, não é cultivável em outros tipos celulares (WOBUS et al., 2004, 2006; HSU et al., 2006;

MUMPHREY et al., 2007; PERRY et al., 2009; KIM et al., 2010). Já foi descrito que este NoVs provoca diminuição da consistência das fezes e inflamação intestinal moderada em camundongos selvagens infectados (MUMPHREY et al., 2007; LIU et al., 2009).

Baseado no tropismo observado no NoVs murino, tentou-se cultivar o vírus Norwalk G1.1 em células dendríticas e macrófagos, porém sem evidencia de replicação viral (KARST, 2010). Também já foi relatado que ratos imunodeficientes naturalmente infectados com NoVs murino, apresentaram antígeno viral no citoplasma de células inflamatórias no fígado, baço, lâmina própria intestinal, folículos linfóides do intestino, pulmão, cavidades pleural e peritoneal, e nódulos linfáticos mesentéricos (WARD et al., 2006, PERDUE et al., 2007).

Acredita-se que o interferon possa restringir o tropismo celular de NoVs, como já foi demonstrado para outros vírus (RYMAN et al., 2000). Se este for o caso, o diferente tropismo celular apresentado pelos NoVs pode ser definido conforme a diferente sensibilidade dos vírus às respostas de interferon (KARST, 2010).

3.8 VARIABILIDADE E RECOMBINAÇÃO

A recombinação de RNA é uma das forças motrizes da evolução dos vírus. Pode afetar os agrupamentos filogenéticos, aumentar a virulência e confundir estudos epidemiológicos e moleculares, tendo grandes implicações nas estratégias de concepção de vacinas (BULL et al., 2007).

Pode-se definir um NoVs recombinante a partir da análise filogenética de duas regiões diferentes do genoma, geralmente o capsídeo e a RdRp, de *clusters* de dois grupos distintos (BULL et al., 2005). Os eventos de recombinação já foram descritos ocorrendo entre as regiões ORF 1/ORF 2, RdRp/ORF 2 e ORF2/ORF3 (WATERS et al., 2007; ROHAYEM et al., 2005; CHHABRA et al., 2010). Existem três tipos de recombinação: intergenogrupo (entre genogrupos distintos), intergenotipo (entre genótipos distintos) e intragenotipo (entre

mesmos genótipos), sendo a recombinação intergenotípica a mais frequentemente observada. Alguns pesquisadores ainda dividem as cepas em intersubgenótipos recombinantes (PHAN et al., 2007). Somente uma recombinação intergenogrupo já foi reportada na literatura ocorrendo entre GI.3/GII.4 e nove recombinações intragenotípicas entre GII já foram relatadas (ROHAYEM et al., 2005; ETHERINGTON et al., 2006; PHAN et al., 2006).

A recombinação é mais observada em 3 dos 5 genogrupos (GI, GII e GIII) (KATAYAMA et al., 2002; HAN et al., 2004). Contudo, GII apresenta o maior número de genótipos variantes do tipo 4 que causam a maioria dos surtos e casos esporádicos no mundo (CASTILHO et al., 2006). No entanto, um recombinante GII.b/GII.3 tem sido descrito como o principal responsável por surtos na Europa, Austrália e Ásia (AMBERT-BALAY et al., 2005; BULL et al., 2005; PHAN et al., 2006, 2007).

Não existe uma classificação específica para linhagens recombinantes e um sistema de genotipagem amplamente aceito ainda é necessário, gerando dificuldades em definir o número e tipos de recombinantes em circulação. Apesar dessas dificuldades, pesquisas demonstram a maior circulação de 20 diferentes tipos recombinantes de NoVs no mundo (um GI, 17 GII e dois GIII) (BULL et al., 2007).

Existem vírions pertencentes ao genogrupo II, que ao terem a região da RdRp de seus genomas sequenciada, não apresentam classificação conhecida. Entretanto, quando sequenciada a região do capsídeo, podem apresentar alguma classificação, porém diferente daquela observada pela RdRp, sendo então denominadas de variantes. Para essas cepas, há a necessidade de um sistema de classificação que as diferencie daquelas que apresentam igual classificação quando caracterizadas por ambas as regiões do genoma (RdRp e capsídeo), sendo comumente caracterizadas como GII.a, GII.b, GII.c, GII.d ou GII.e (BUESA et al., 2002; BULL et al., 2007).

A identificação de novos *clusters* não é incomum. Diferentes grupos de pesquisa têm caracterizado cepas circulantes de NoVs e constantemente tem relatado novos genótipos (VIDAL et al., 2006).

Na Austrália foram detectados diversos genótipos (GII.1, GII.3, GII.4, GII.6, GII.7 e GII.10) de NoVs por Nested RT-PCR/sequenciamento em amostras fecais coletadas de surtos e casos esporádicos de diarreia entre 1997 e 2004. Neste estudo se observou a presença de um GII.4 variante que foi responsável por 18 surtos, sendo também descrito como agente etiológico de epidemias na Holanda, Japão e Taiwan entre 2004 e 2005 (BULL et al., 2006).

No Chile, a análise parcial do genoma do capsídeo e da RdRp de amostras provenientes de 13 surtos ocorridos entre 2001 e 2003 demonstrou que os mesmos foram ocasionados por cepas geneticamente diversas, agrupadas principalmente dentro de GII e por 5 possíveis linhagens recombinantes (VIDAL et al., 2006).

No Japão, entre 2004 e 2005, foram testadas por RT-PCR convencional amostras de casos esporádicos de gastroenterite em que se detectaram vários genótipos (GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.6 e GII.7). Neste estudo se observou quatro tipos recombinantes co-circulando e a linhagem GII.b surgiu como a principal responsável pelos quadros de diarreia no Japão (PHAN et al., 2007).

Outras linhagens também foram observadas no Japão em uma pesquisa envolvendo 100 surtos ocorridos em hospitais, asilos, escolas e instalações sociais em 2006. Foram detectados os tipos GI.4, GI.8, GII.2, GII.3, GII.4 e GII.12. Com relação ao genótipo GII.4, três diferentes subtipos foram observados (GII.4d, GII.4e e GII.4f) sendo o último o mais prevalente (OKADA et al., 2007).

Na Suécia, amostras de 115 surtos nosocomiais ocorridos em hospitais, asilos e outras instituições de saúde entre 1997 e 2005 foram testadas e demonstraram que as duas principais

epidemias ocorridas nos invernos de 2002/2003 e 2004/2005 foram ocasionadas por duas cepas variantes fortemente relacionadas com GII.4 (JOHANSEN et al., 2008).

Na Índia, um estudo da análise parcial do gene da RdRp e do capsídeo, envolvendo crianças diarreicas positivas para NoVs demonstrou uma nova variante de GII.4, denominada GII.4/2007 e outros 3 novos intergenotipos recombinantes de GII, indicando a marcante variabilidade genética dos NoVs nesse país (NAYAKA et al., 2009). Também na Índia, espécimes fecais de crianças menores de 5 anos hospitalizadas e atendidas ambulatorialmente foram testadas por RT-PCR convencional, observando-se a co-circulação de GII.1, GII.2, GII.3 e da variante GII.b, detectada pela primeira vez nesse país (CHHABRA E CHITAMBAR, 2008). Esta última também foi a mais prevalente em crianças menores de 2 anos e meio de idade atendidas em um hospital holandês durante 5 invernos consecutivos (2002-2007) (BEERSMA et al., 2009).

Em 2006 foi registrado, na Austrália e Nova Zelândia, o surgimento de duas novas variantes GII.4 (2006a e 2006b) que foram implicadas como as responsáveis pelo aumento da gastroenterite em toda a Europa naquele ano (TU et al., 2008). Ainda em 2006, a cepa 2006a foi a principal responsável por um surto de gastroenterite ocorrido na Alemanha (HOFFMANN et al., 2010). Em 2007 e 2008 foi descrita, na Coreia do Sul, a ocorrência de GII.4 em amostras provenientes de crianças com gastroenterite aguda, estando as mesmas intimamente relacionadas com a cepa 2006b também descrita na China, Hong Kong, e Japão (LE et al., 2010).

Um estudo realizado no Canadá analisou 707 surtos ocorridos na província de Alberta e territórios do norte por um período de 9 anos (2000-2008). A caracterização molecular das amostras demonstrou uma grande variedade de cepas GII.4 consideradas variantes (GII.4-1996, GII.4-2002, GII.4-2004, GII.4-2006a, GII.4-2006b, GII.4-2008a e GII.4-2008b). As duas variantes que surgiram em 2006 tiveram ampla distribuição geográfica e ocasionaram a

maioria dos surtos em comparação com as demais. As linhagens variantes foram mais comumente associadas com surtos em hospitais, enquanto as não variantes foram mais prevalentes em escolas e eventos sociais (PANG et al., 2010).

Um estudo analisou surtos ocorridos em vários países nos cinco continentes entre os anos de 2001 e 2007 e observou oito variantes de GII.4, sendo quatro de distribuição global (linhagens 1996, 2002, 2004 e 2006b). As variantes 2001Japan e 2001Henry também foram encontradas em todo o mundo, porém em baixa frequência; e a 2003Asia e 2006a causaram epidemias geograficamente limitadas (SIEBENGA et al., 2009).

Na Alemanha, durante surto de gastroenterite ocorrido em 2006, duas cepas foram detectadas, a GII.4-2006a que foi a predominante e a GII.7 que acometeu dois indivíduos imunocomprometidos. Nestes pacientes, o genótipo observado foi similar ao isolado em 1990 e 1994 na Ásia, sugerindo uma lenta evolução viral, com evidencia de recombinação (HOFFMANN et al., 2010).

3.9 PATOFISIOLOGIA DA INFECÇÃO VIRAL

A infecção por NoVs é autolimitada, com duração em geral de 24-48 horas, que pode ou não requerer hospitalização e terapia de reidratação. Por muito tempo, o conhecimento acerca da patogênese da infecção viral foi habitualmente obtido de estudos de inoculação em voluntários (GRAHAM et al., 1994).

O vírus provoca lesões histopatológicas transitórias na mucosa do intestino delgado, que inclui alargamento das vilosidades e o encurtamento dos microvilos. Infiltração de células mononucleares na lâmina própria e vacuolização do citoplasma são observadas em pessoas infectadas. Ainda não foi detectado o vírus ou o antígeno viral nas células intestinais, porém estão presentes nas fezes e no vômito. A excreção viral atinge seu pico no primeiro e no segundo dia após a infecção, podendo continuar por mais duas semanas (alguns autores

afirmam até 100 dias), mesmo após os sintomas clínicos terem cessado. Podem, também, ser excretados por indivíduos assintomáticos (infecções subclínicas). Na fase aguda da doença, as mucosas gástrica e retal não são afetadas histologicamente e os níveis de adenilato ciclase na mucosa jejunal não são alterados, ou seja, sem o aumento da presença dessa enzima, não há a produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que resultaria em hipersecreção de eletrólitos e água, gerando diarreia do tipo secretora, frequentemente de grave intensidade (KAPIKIAN et al., 1996; ESTES et al., 2000; KIRKWOOD E STREITBERG, 2008; LOPES E PINTO, 2010).

Todavia, vários fatores virais podem interferir com as funções celulares básicas, sem causar morte celular, porém gerando quadro diarreico. Uma delas é a proteinase 3C-like (3CLpro), que é semelhante a uma enzima previamente descrita em rinovírus chamado 3Cpro. Esta enzima interfere com tradução eucariótica pela clivagem da cauda poli (A) do material genético da célula infectada. A inibição da tradução na célula do hospedeiro pode limitar a abundância de reguladores importantes da homeostase intestinal. Outro mecanismo que tem o potencial de interferir com proteínas do hospedeiro envolve a proteína não-estrutural p48 do vírus, a qual interage com outras que são reguladoras de tráfego de vesícula. Tal como acontece com a inibição da tradução, a inibição do tráfego de proteína é susceptível de interferir com processos celulares críticos para manter a função de absorção (HODGES E GILL, 2010).

Recentemente foi realizado um estudo com biópsias intestinais de pacientes que sofreram de infecção por NoVs. Em 123 observações iniciais, verificou-se que a altura das vilosidades foi reduzida em 25% dos casos, enquanto a profundidade das criptas permaneceu inalterada, reduzindo a superfície total de absorção do epitélio (figura 4). Os níveis de Na^+ não foram alterados, no entanto houve um aumento da secreção de íons Cl^- além de uma acentuada diminuição na resistência transepitelial. Pelo fato de só recentemente as pesquisas

em cultura de células terem avançado, o entendimento dos mecanismos patogênicos do NoVs ainda é muito limitado, necessitando de extensas pesquisas. O conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos desse patógeno pode ajudar a identificar novos alvos terapêuticos, não só para a diarreia associada com infecções entéricas, mas também para uma variedade de outras doenças diarreicas (HODGES E GILL, 2010).

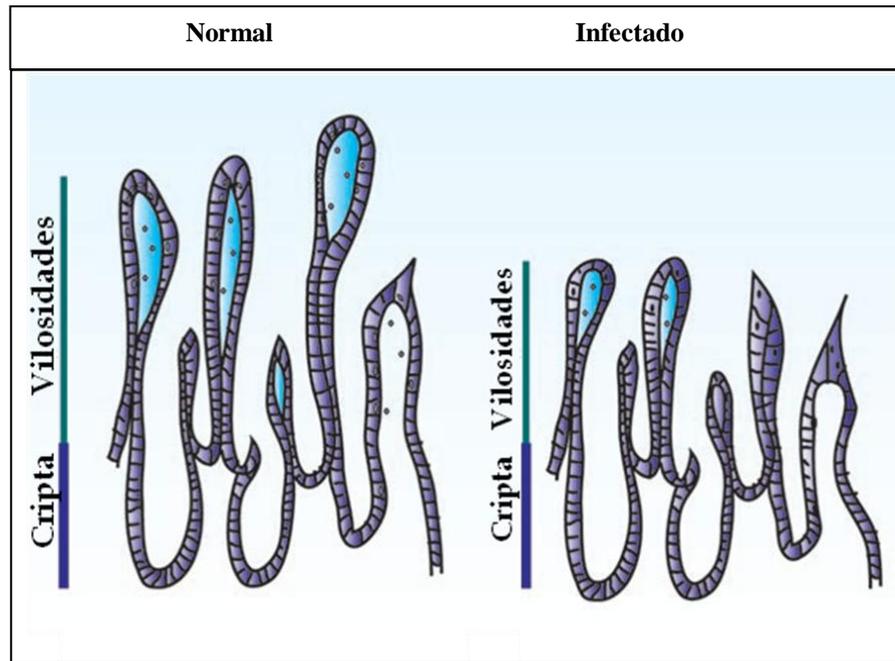


Figura 4. Redução da altura das vilosidades do intestino em resposta à infecção viral por norovírus. Imagem adaptada de Hodges e Gill (2010).

3.10 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

Nos primeiros estudos realizados em voluntários sobre a resposta imune do hospedeiro à infecção pelo NoVs, constatou-se que a maioria ficou doente após exposição ao vírus. Isto reforçou a idéia de que grande parte da população não possuía imunidade natural ao patógeno ou este apresentava mecanismos que facilitavam sua evasão à resposta imune do hospedeiro. Estudos posteriores demonstraram que indivíduos que apresentaram a doença não desenvolveram novamente a enfermidade até 14 semanas após reinfecção, sugerindo uma imunidade de curto prazo (WYATT et al., 1974).

Essas observações iniciais foram confirmadas nos anos posteriores e os conhecimentos acerca da imunologia do NoVs foram ampliados quando testes sorológicos mais sensíveis se tornaram comercialmente disponíveis. Pode-se citar, como a principal ferramenta de investigação, o imunoensaio em fase sólida, que contou com antígenos virais nativos e soro pareado de infecção humana (GREENBERG et al., 1978).

Muitos estudos soroepidemiológicos visando a detecção de anticorpos contra NoVs foram realizados envolvendo, principalmente, soro de crianças em várias localidades. Em geral, nos países desenvolvidos, a prevalência de anticorpos é mais baixa em crianças de 0>5 anos, os quais aumentam com a idade (GREENBERG et al., 1979).

As diferenças observadas em termos de taxa de anticorpos envolvendo crianças/adultos e crianças provenientes de distintas populações podem ser justificadas por fatores sócio-econômico-culturais que influenciam na precoce ou tardia obtenção de anticorpos. Por exemplo, em adultos de países economicamente desenvolvidos, o nível de anticorpos no soro pode ser um indicador de exposição passada, em vez de infecção recente. Enquanto que em populações de países em desenvolvimento, a frequência com que as crianças são expostas ao vírus pode ser tão habitual, devido viverem em aparente contaminação ambiental (condições sanitárias inadequadas) e aglomerações, que a imunidade em longo prazo pode não ser observada (PARKER et al., 1994; MATSUI E GREENBERG, 2000).

São comuns os estudos imunológicos com a utilização de partículas virais recombinantes produzidas em sistemas de expressão em baculovírus, comparáveis em tamanho, estrutura e propriedades antigênicas aos vírions nativos. A possibilidade de possuir uma fonte facilmente renovável de partículas recombinantes uniformes ampliou o desenvolvimento de imunoensaios mais sensíveis e altamente específicos, como os NoVs

recombinantes e EIA, que até hoje estão amplamente disponíveis para uma variedade de aplicações (GREEN et al., 1993).

Atualmente, sabe-se que a infecção causada por este patógeno induz uma resposta imune pela produção de anticorpos da classe IgG, IgA e IgM, os quais proporcionam uma proteção contra reinfecções por um período de 4 a 6 meses (LINDESMITH et al., 2005).

No Brasil, um estudo envolvendo 8 comunidades indígenas da Região Amazônica demonstrou que as tribos apresentaram de 39% a 100% de soropositividade para o NoVs, não se observando uma diferença significativa na prevalência de anticorpos entre as diferentes faixas etárias, evidenciando a presença deste patógeno também em comunidades isoladas do País (GABBAY et al., 1994). Em nossa região, estudos sorológicos realizados em 37 crianças demonstraram que aos três anos de idade, 94,6% já possuíam anticorpos contra NoVs (MENDES, 1997).

3.11 NOROVÍRUS E O GRUPO ABO

Diversos estudos têm demonstrado uma correlação entre o grupo sanguíneo ABO e infecção intestinal por vários patógenos. Por exemplo, o fenótipo “O” parece ter influência na gravidade dos sintomas de pacientes com cólera, bem como no desenvolvimento de úlceras duodenais causadas por *Helicobacter pylori* (MENTIS et al., 1991; ALBERT, 1996).

Estudos demonstram a associação entre o fenótipo ABO e o risco de infecção/desenvolvimento de doença sintomática gerada pelo NoVs. De acordo com Hutson et al. (2002), indivíduos do grupo sanguíneo “B” têm menor chance de se infectarem com o vírus do que aqueles pertencentes ao grupo “O”.

Autores sugerem que a presença da D-galactose terminal do antígeno “B” possa de alguma forma alterar a partícula de NoVs e impedir sua ligação à célula hospedeira, porém isto não é consenso entre diferentes pesquisadores (MEYER et al., 2004).

Outros, no entanto, atribuem ao gene *FUT2* (codificador da enzima α 1,2 fucosiltransferase) responsável por expressar o carboidrato H tipo 1 (encontrado na superfície das células epiteliais do intestino delgado e em secreções como a saliva) a responsabilidade por esta relação (infecção x sistema ABO). Acredita-se que este carboidrato seja um receptor para o NoVs. Desta maneira, a proteção contra a infecção viral ocorre quando outras glicosiltransferases (agora àquelas que determinam o fenótipo do sistema ABO sanguíneo) encontradas também na superfície das células epiteliais do intestino, têm a capacidade de modificar a estrutura do carboidrato H tipo 1, tornando-o inativo e prejudicando sua função como receptor dos NoVs. Supõe-se que este processo ocorra com pessoas do grupo sanguíneo “B”, conferindo maior proteção àqueles que apresentam este fenótipo (HARRINGTON et al., 2002; MARIONNEAU et al., 2005).

Estudos indicam que as diversas linhagens de NoVs podem atuar de maneiras diferentes na associação da partícula viral aos antígenos do grupo sanguíneo ABO. O NoVs tipo GII.4 conhecido globalmente por causar epidemias, tem mais facilidade de se ligar a esses antígenos que os outros genótipos, o que pode explicar sua prevalência mundial (SHIRATO et al., 2008). Além disso, existem evidências de que componentes extracelulares encontrados nas fezes possam ter papel importante na ligação do vírus ao antígeno do grupo sanguíneo, potencializando o ataque e a infectividade *in vivo* (HARRINGTON et al., 2004).

A pesquisa a respeito da relação do NoVs com o grupo ABO é importante, pois este vírus apresenta grupos antigenicamente diversos e a possível identificação de um epítipo comum de ligação com a célula hospedeira é fundamental no desenvolvimento de futuras vacinas (SHIRATO et al., 2008).

3.12 SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA

Embora o NoVs seja altamente infeccioso, experimentos em voluntários demonstram que alguns sujeitos permanecem saudáveis, sem desenvolver a doença, mesmo após a inoculação de grandes doses virais. Este mecanismo ainda não está bem esclarecido, porém poderia estar relacionado a uma resistência inata ou a uma imunidade pré-existente à infecção viral (MATSUI E GREENBERG, 2000).

Um estudo com amostras de saliva evidenciou que indivíduo com mucosa secretora do carboidrato H tipo 1 é um importante preditor de susceptibilidade, enquanto a resposta imune gravada na memória da mucosa pode estar associada à proteção contra o patógeno, apesar de nunca ter sido identificado nenhum componente imunológico específico de proteção. (LINDESMITH et al., 2003). São descritas até 3 respostas em indivíduos inoculados com NoVs: (1) resistência à infecção apesar de repetidas inoculações; (2) desenvolvimento de imunidade protetora e (3) susceptibilidade apesar de várias inoculações (JOHNSON et al., 1990).

No que diz respeito à resistência, autores sugerem que até dois mecanismos podem ser observados: (1) resistência genética inata mediada pela inativação do alelo *FUT2* (gene responsável por expressar o fenótipo secretor) e (2) imunidade adquirida caracterizada pela rápida produção de IgA NoVs-específica na mucosa em indivíduos secretores. Seja qual for o mecanismo, observa-se alto percentual de indivíduos resistentes (LINDESMITH et al., 2003).

Em relação à susceptibilidade à infecção pelo NoVs, as diferenças genéticas não explicam, totalmente, os diversos padrões de respostas à inoculação, indicando que essa susceptibilidade é multifatorial (GRAHAM et al., 1994).

3.13 PERSISTÊNCIA DAS NOROVIROSES EM POPULAÇÕES HUMANAS

As pesquisas sobre a persistência do NoVs na população humana tem como principal alvo de estudo a cepa epidêmica, globalmente conhecida, GII.4. Esta linhagem evoluiu na população durante aproximadamente 20 anos, uma vez que não há evidências de sua existência antes de meados da década de 1980, enquanto que outros genogrupos têm sido isolados desde a década de 1960. Sua emergência foi marcada por uma evolução em que os *clusters* iniciais foram submetidos a períodos de “hibernação”, seguido de surgimento de epidemias que posteriormente evoluíram de forma mais rápida e linear (SIEBENGA et al., 2007; LINDESMITH et al., 2008).

Atualmente, dados indicam que diferenças estruturais permitem que esta cepa escape da resposta imune pré-existente. Novas linhagens emergem a partir da seleção do sistema imune, resultando em variantes que são competentes para infectar os mesmos indivíduos infectados anteriormente. Como consequência dessa seleção, essa variante pode evoluir e se especializar na associação com determinado grupo sanguíneo ABO, fazendo com que indivíduos resistentes a uma cepa sejam sensíveis à outra (DONALDSON et al., 2008).

Mudanças de aminoácidos no subdomínio P1 ou P2 (responsáveis pela estabilidade do capsídeo e pelas protruções do vírion) podem resultar em grandes alterações no uso do receptor e na antigenicidade, gerando a persistência do vírus por dois mecanismos: (1) adaptação, conduzida pela imunidade, resultando na capacidade do vírus em se ligar a diferentes receptores, inclusive àqueles relacionados ao grupo sanguíneo ABO, permitindo expansão para uma gama de hospedeiros e penetração na população previamente virgem. (2) variação, que permite escapar da imunidade predominante, resultando em um vírus competente em acometer uma mesma população anteriormente infectada (DONALDSON et al., 2008) (figura 5).

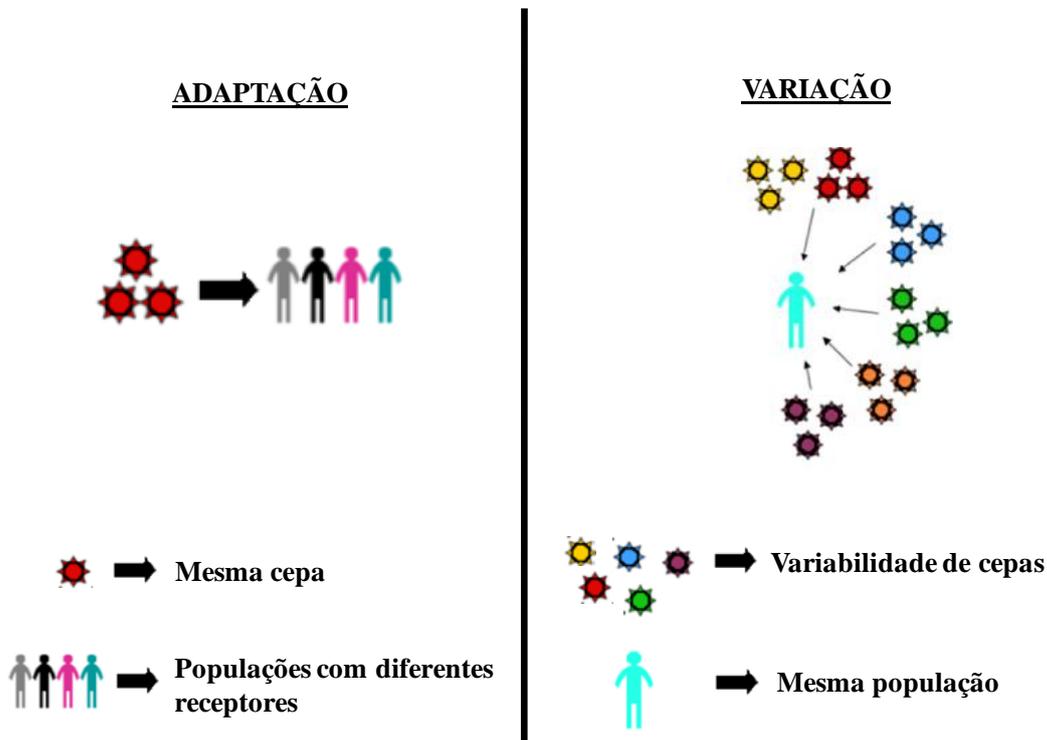


Figura 5. Ilustração simplificando os dois mecanismos de persistência da linhagem GII.4 na população humana. Adaptado de Donaldson et al. (2008).

Entender o porquê da linhagem GII.4 ter evoluído para cepas pandêmicas, tão bem sucedidas em escapar do sistema imunológico humano, enquanto outras linhagens estavam co-circulando na época de seu surgimento, é uma questão que só pode ser respondida quando comparados os perfis evolucionários e os modelos estruturais dos diferentes tipos de NoVs circulantes na população (LINDESMITH et al., 2008).

3.14 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A análise laboratorial para a detecção do NoVs pode ser realizada em vários espécimes clínicos como fezes, vômito, saliva e soro sanguíneo (MOE et al., 2004; TAKANASHI et al., 2009; ATMAR et al., 2011; KIRBY et al., 2011).

A ausência de um método de diagnóstico rápido, sensível e de baixo custo financeiro é o maior obstáculo na detecção de infecções por NoVs em laboratórios de saúde pública e

hospitais, especialmente devido à diversidade gênica e antigênica deste grupo de vírus (GONZÁLEZ et al., 2006).

Durante muitos anos, esse vírus foi diagnosticado pela ME, porém nas últimas décadas a introdução da técnica de RT-PCR convencional melhorou consideravelmente a sensibilidade de detecção, tornando-se o teste padrão para o diagnóstico destes patógenos. Apesar da sua sensibilidade, a RT-PCR é um método de alto custo, demorado, que requer pessoas bem treinadas e equipamentos sofisticados, não sendo disponível na rotina da maioria dos laboratórios de diagnóstico (KHAMRIN et al., 2008).

Estudos utilizando a RT-PCR apresentam grande variação no que diz respeito aos iniciadores de cadeia utilizados. Trabalhos envolvendo a amplificação nucleotídica parcial das regiões A, B, C, D e E do genoma do vírus são comumente reportados na literatura (JIANG et al., 1999; ANDERSON et al., 2001; KOJIMA et al., 2002; VINJÉ et al., 2004; SIEBENGA et al., 2009).

Geralmente, há a necessidade do uso de metodologias complementares após a realização da RT-PCR convencional, como o sequenciamento nucleotídico ou a hibridização por blot, a fim de caracterizar os genogrupos e genótipos de NoVs (BRUIN et al., 2006). Alternativamente à RT-PCR, técnicas mais sensíveis de amplificação do genoma viral como a semi-nested RT-PCR também já foram descritas (BOXMAN et al., 2006).

O advento da técnica de PCR em tempo real revolucionou o processo de detecção/quantificação de fragmentos de RNA e DNA para diagnóstico microbiológico. Esta técnica tem como vantagem ser muito mais sensível que todas as outras já descritas, ser de fácil quantificação, rápida análise, alta reprodutibilidade e precisão, melhor controle de qualidade e baixo risco de contaminação. Sua desvantagem em relação às outras metodologias de amplificação é o alto custo para sua manutenção (TRUJILLO et al., 2006; VALONES et al., 2009).

Recentemente, têm sido divulgados inúmeros EIA comerciais e de imunocromatografia, bem como técnicas de amplificação isotérmica e DNA Microarray para detecção e caracterização simultânea de NoVs (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2008; KHAMRIN et al., 2008; PAGOTTO et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2011). Estas técnicas têm sido descritas como metodologias complementares à RT-PCR, podendo ser valiosa na investigação de surtos de gastroenterite (DIMITRIADIS et al., 2006).

3.15 EPIDEMIOLOGIA

3.15.1 Epidemiologia no mundo

3.15.1.1 Surtos

O NoVs é mundialmente conhecido como o principal responsável por surtos de gastroenterite viral em pessoas de todas as idades. Critérios epidemiológicos descritos por Kaplan et al. (1982) definem como surto de gastroenterite por NoVs, a presença de vômito em mais da metade das pessoas afetadas, tempo médio de incubação da doença de 24-48 horas, duração média de sinais e sintomas clínicos de 12-60 horas e a ausência de patógenos bacterianos em cultura de fezes. Estudo realizado por Turcios et al. (2006) demonstrou que o conjunto de critérios de Kaplan é altamente específico (99%) e moderadamente sensível (68%) para diferenciar surtos ocasionados pelo NoVs daqueles causados por bactérias, sendo considerados, até hoje, muito úteis para esta distinção.

Novos métodos moleculares permitiram rastrear a origem de surtos, levando a identificação do vírus em águas/alimentos contaminados (especialmente mariscos) e manipuladores de alimentos (GLASS et al., 2000).

Acredita-se que mais de 80% dos surtos e 18% dos casos esporádicos de diarreia registrados na Holanda entre 1998 e 1999 foram causados por NoVs (KOOPMANS et al.,

2000). Na Espanha, 60 surtos afetaram 1791 pessoas entre 2004 e 2005, apresentando uma incidência global de 24,6 por 100 pessoas/ano (ARIAS et al., 2010).

Durante a ocorrência de um surto em uma escola primária do Reino Unido em 2001, foi demonstrada a implicação de aerossóis gerados por vômitos como veículo de infecção aérea dos NoVs (MARKS et al., 2003). Na Austrália, entre 1997 e 2000, observou-se uma grande atividade da linhagem epidêmica GII.4, com diminuição de sua ação entre 2001 e 2004 quando outra linhagem GII.4 (variante) surgiu no mundo e gerou surtos predominantemente em hospitais e asilos. Acredita-se que só em 2004, mais de 400 surtos ocorreram e 15.000 pessoas apresentaram a doença nesse país (TU et al., 2007).

Nos EUA, em 2004, um surto nosocomial acometeu pacientes e profissionais de saúde de duas unidades (psiquiátrica e coronariana) de um hospital. O custo estimado dos prejuízos com apenas esse surto foi de \$657.644 dólares entre fechamento das unidades, licença médica e despesas com limpeza (JOHNSTON et al., 2007). Um total de 38 surtos nosocomiais foi confirmado em Hong Kong, no ano de 2006. A maioria dos pacientes acometidos foram idosos com mobilidade reduzida e que apresentaram sintomas prolongados da doença causada por NoVs (TSANG et al., 2008).

Um estudo realizado no Canadá demonstrou que pacientes com quadro de gastroenterite após um surto provavelmente causado por NoVs, desenvolveram a Síndrome do Intestino Irritável pós-infecção, afecção crônica do trato gastrointestinal, cujos sintomas podem ser secundários a uma lesão aguda na mucosa após uma gastroenterite viral (MARSHALL et al., 2007).

3.15.1.2 Hospitalizações

O NoVs também têm grande importância em casos de gastroenterite aguda esporádica que requerem hospitalizações. Um estudo realizado com amostras coletadas entre 2005 e 2008

na Alemanha, investigou os principais patógenos responsáveis por ocasionar gastroenterite grave em crianças hospitalizadas, demonstrando ser o NoVs o segundo patógeno mais prevalente, apresentando um percentual menor apenas que o do RoVs (WIEGERING et al., 2011). Outro estudo semelhante desenvolvido na Tanzânia, detectou 13,7% de NoVs acometendo crianças hospitalizadas em um dos 4 principais hospitais pediátricos de Dar es Salaam (MOYO et al., 2011).

Nos EUA, a análise de um conjunto representativo de dados nacionais a respeito de todas as internações por gastroenterite entre os anos de 1996 e 2007, revelou que, neste período, houve aproximadamente 71.000 hospitalizações associadas à infecção por NoVs, podendo ter chegado a 110.000 internações em temporadas de epidemia, gerando um prejuízo de \$493 milhões (LOPMAN et al., 2011).

Pesquisa conduzida em Taiwan envolvendo crianças menores de 5 anos internadas em decorrência de diarreia aguda, demonstrou que 14,6% das hospitalizações foram em virtude de infecção por NoVs, sendo que além da diarreia, 74,8% apresentaram vômito e 71,3% febre branda (YANG et al., 2010).

Os NoVs foram implicados em 8,3% dos casos de gastroenterite aguda ocorridos em crianças internadas no período de 2001 a 2004 em um hospital universitário de Paris. Contudo, apesar da necessidade de hospitalização, essas crianças apresentaram quadro clínico com menor gravidade que aqueles com diarreia associada à infecção por RoVs, especialmente quando comparados o tempo de hospitalização e a necessidade do uso de reidratação intravenosa (LORROT et al., 2011).

Estudo conduzido na Espanha envolvendo crianças menores de 5 anos hospitalizadas com gastroenterite entre os anos de 2006 e 2007, demonstrou que o NoVs apresentou uma prevalência de 27%, sendo maior do que para RoVs (21%). Contudo, o quadro clínico das

crianças acometidas por NoVs foi mais brando do que o observado pelas infectadas por RoVs (GONZALEZ-GALAN et al., 2011).

3.15.2 Epidemiologia no Brasil

No Brasil, algumas pesquisas já foram realizados envolvendo os aspectos epidemiológicos e moleculares desse vírus. A diversidade genômica do NoVs foi investigada em um estudo longitudinal conduzido em favelas urbanas de Fortaleza envolvendo 120 crianças entre 1990 e 1991 cuja positividade foi de 12,5% (PARKS et al., 1999). Entre 2004 e 2005, esse patógeno também foi detectado em 15% das crianças hospitalizadas de Recife (NAKAGOMI et al., 2008).

Em Salvador, um estudo longitudinal com amostras coletadas entre 2001 e 2002 envolvendo crianças moradoras de 21 áreas de baixa-renda, demonstrou a circulação dos NoVs GII em 5% dos casos (XAVIER et al., 2009). Em 2006, um surto acometeu jovens adultos na mesma cidade, sendo identificado o genogrupo II, tipos 3 (8,8%), 4 (72,5%) e 9 (10%) (CAMPOS et al., 2008).

Em 1996, foi registrado na Baixada Santista (SP) o primeiro surto causado por esse grupo de vírus no Brasil (UEDA et al., 1996), sendo também responsável por outros ocorridos na capital paulista nos anos de 1995, 2004, 2005 e 2006 com positividade de 15,7% (MORILLO et al., 2008). Também em São Paulo, foi detectado NoVs GII.4 em 33,3% das crianças atendidas ambulatorialmente, inclusive com infecção mista entre diferentes genótipos e possíveis linhagens recombinantes (CASTILHO et al., 2006).

O NoVs também já foi associado a diversos surtos de gastroenterite aguda descritos em creches do Rio de Janeiro (capital [37,6%] e outros municípios [66%]) (GALLIMORE et al., 2004; FERREIRA et al., 2008), bem como já foi encontrado em 14,5% de amostras clínicas de crianças hospitalizadas e atendidas ambulatorialmente na capital carioca (SOARES et al.,

2007). Na região Centro-Oeste, a positividade para NoVs observada entre crianças hospitalizadas foi de 8,6% e no Espírito Santo de 39,7% (BORGES et al., 2006; RIBEIRO et al., 2008).

Estudo sobre a diversidade genética do NoVs no Brasil demonstrou a circulação de vários genótipos de GII (71%) em todas as regiões do país, tanto em casos esporádicos de gastroenterite aguda quanto em surtos. Foi observado o genótipo 2 em São Paulo; tipo 3 (Espírito Santo e São Paulo); tipo 6 (Rio de Janeiro e Pernambuco) em 2006; tipo 7 no Distrito Federal em 2005; tipos 8 e 14 (Rio de Janeiro e Espírito Santo); tipo 12 (Sergipe, Minas Gerais e Rio Grande do Sul) em 2009; e tipos 16 e 17 no Acre em 2005. Também foram registradas as variantes 2006a circulando no Maranhão, Rio Grande do Norte, Alagoas, Ceará, Bahia e Sergipe; e 2006b no Mato Grosso do Sul e em Minas Gerais, entre os anos de 2007 e 2009 (CASTILHO et al., 2006; BARREIRA et al., 2010; FERREIRA et al., 2010; FIORETTI, et al., 2011).

Testes realizados em amostras fecais provenientes de crianças internadas em um hospital público do Estado do Pará demonstraram uma positividade de 15% pela RT-PCR em amostras coletadas entre 1992-1994 (NAKAMURA et al., 2006; SILVA et al., 2006).

Posteriormente, estudos de biologia molecular envolvendo crianças internadas ou atendidas ambulatorialmente, detectaram NoVs circulando em Belém nos anos de 1998-2000, 2003 e 2008-2009 com positivities que variaram de 7,1% a 44,4% (ARAGÃO et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2010a; 2010b).

3.16 SAZONALIDADE

A sazonalidade dos patógenos pode ser definida pelo aparecimento de recorrentes epidemias da doença em definidos períodos do ano e está associada às mudanças ambientais e ao comportamento do hospedeiro (DOWEL, 2001).

Devido ao pouco conhecimento a respeito da sazonalidade dos NoVs, foi realizada uma análise envolvendo 12 pesquisas conduzidas em 8 países em um período de 21 anos (1978 a 1998), a qual constatou que a maior incidência de infecção ocorreu nos meses de inverno e menor nos meses de verão, independentemente do método de detecção usado, idade dos acometidos pela doença ou suspeita do modo de transmissão. Contudo, os picos de incidência da doença não aconteceram obrigatoriamente nos mesmos meses durante o ano e nem nas mesmas regiões, sugerindo que essa sazonalidade possa ser diferente dependendo do local estudado (MOUNTS et al., 2000).

Outros vírus apresentam um padrão de transmissão sazonal no inverno, como o influenza, vírus respiratório sincicial, vírus do sarampo e RoVs, nos quais também se atribuem a transmissão pelo ar, facilitada nos meses frios devido a maior aglomeração de pessoas em locais fechados (PRINCE et al., 1986; MOUNTS et al., 2000).

Mudanças climáticas em nível local, regional ou global geram variações no padrão pluviométrico, temperatura do ar, ventos e correntes do oceano, que resultam em mudança no padrão de incidência e transmissão do patógeno e alteram os conhecimentos epidemiológicos e de morbi-mortalidade (CHAN et al., 1999). Esses fatores, especialmente umidade, contribuem para o aumento do risco de contaminação por RoVs e poliovírus pela manutenção da viabilidade desses vírus nas superfícies (fômites) (NATHANSON E MARTIN, 1979; PRINCE et al., 1986) e podem influenciar na resistência, transmissão e/ou virulência do patógeno. O fato do NoVs e RoVs apresentarem padrões similares de transmissão e tropismo, faz presumir que ambos compartilham similaridade em termos de sazonalidade (ROHAYEM, 2009).

Independentemente da estação do ano, aglomerados de indivíduos facilitam a transmissão da doença. Pesquisas demonstram que o padrão de transmissão depende da taxa

de contato entre as pessoas; por exemplo, é verificada uma maior ocorrência de infecções por NoVs em crianças durante no período escolar do que nas férias (FINE E CLARKSON, 1982).

Estudos revelam que a vitamina D é um importante regulador da função fagocitária das células imunes e está associada com a resposta antiviral à infecção pelo vírus influenza. Durante o inverno, a radiação ultravioleta (UV) diminui e conseqüentemente ocorre a menor produção de vitamina D, levando ao comprometimento do sistema imune e possível aumento da susceptibilidade às infecções virais. Não é claro se este mesmo processo é atribuído à infecção pelo NoVs, contudo, é um campo de pesquisa que deve ser considerado para se entender melhor a relação da sazonalidade do patógeno com o organismo do hospedeiro (CANNELL et al., 2006; ROHAYEM, 2009).

Para o entendimento completo de como as mudanças ambientais podem afetar a epidemiologia do NoVs, é necessário o conhecimento de todos os fatores que determinam sua sazonalidade (comportamento e susceptibilidade do hospedeiro, transmissão viral e competência do vírus em seu ambiente natural). Vigilância epidemiológica, monitoramento climático, pesquisas multidisciplinares envolvendo virologistas, climatologistas, ecologistas e epidemiologistas são medidas fundamentais para controlar a doença e diminuir os custos com serviços de saúde pública (ROHAYEM, 2009).

3.17 ASPECTOS CLÍNICOS

Diversos sintomas clínicos são observados em pessoas acometidas por NoVs, tais como súbito início de náuseas, vômitos, diarreia não sanguinolenta, hiperemia moderada, dores abdominais/epigástricas, mialgia, cefaléia, astenia, calafrios e mal-estar geral (CDC, 2011).

Autores sugerem que exista relação entre o genótipo do NoVs e os sinais/sintomas apresentados durante a infecção. Em um estudo envolvendo 28 surtos em asilos da Holanda, o NoVs GII.4 foi responsável por 21 deles. Nos surtos causados por este genótipo, os

principais sinais/sintomas manifestados foram vômito, náuseas, cólicas abdominais, febre e muco nas fezes. Nos surtos causados pela variante GII.4-2004, houve maior predominância dos sintomas náuseas, dores de estômago e febre quando comparados à linhagem GII.4-2006a, demonstrando que conforme a cepa, pode ocorrer variações nos sinais/sintomas (FRIESEMA et al., 2009).

É reconhecido que o NoVs seja um enteropatógeno viral que afeta indistintamente todas as faixas etárias. Contudo, as faixas extremas de idade (infância e velhice) são mais gravemente acometidas em virtude de possuírem sistema imunológico mais debilitado. Um estudo com recém nascidos prematuros de uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal demonstrou que esses menores apresentaram um padrão diferente de sintomas durante a infecção por NoVs com predominância de abdome distendido e apnéia. Vômitos não foram observados nestes casos (ARMBRUST et al., 2009). Outra pesquisa também realizada em UTI neonatal revelou a associação do NoVs com a enterocolite necrosante em crianças expostas (TURCIOS et al., 2008).

Um estudo analisou a infecção por NoVs como sendo fator de risco para complicações clínicas de outras enfermidades. A investigação de 5 surtos em enfermarias de um hospital universitário na Alemanha demonstrou que a infecção por NoVs gerou falência renal aguda, sinais de rejeição após transplante de rins, arritmia cardíaca, imunossupressão e aumento da duração da diarreia em pacientes idosos (MATTNER et al., 2006).

Desde 1982, vários trabalhos já demonstraram a associação de quadros clínicos de convulsões benignas com gastroenterite leve (MOROOKA, 1982). Atualmente, esta condição é reconhecida como uma entidade clínica distinta, caracterizada por critérios bem definidos, relacionada geralmente às infecções gastrintestinais causadas por RoVs e NoVs, cuja terapia envolve inclusive a administração de anticonvulsivantes (KAWANO et al., 2007).

Estudos com pacientes pediátricos demonstram que existe associação da infecção por NoVs com a exacerbação de doença inflamatória intestinal. Acredita-se que quando o NoVs está relacionado a este quadro clínico, é mais provável a presença de hematoquezia (sangramento vivo intestinal) nas crianças (KHAN et al., 2009).

Apesar de tantas descrições clínicas da associação do NoVs com outras doenças, mais dados de estudos analíticos são necessários para confirmar uma ligação causal com estas condições (CDC, 2011).

3.18 TRANSMISSÃO

A alta infecciosidade destes patógenos sugere uma grande quantidade de rotas de transmissão, sendo a principal delas a fecal-oral, pelo consumo de água e alimentos contaminados, contato pessoa a pessoa, fômites e aerossóis/gotículas de vômitos (CDC, 2011) (figura 6).

3.18.1 Transmissão zoonótica

Os NoVs já foram detectados em uma variedade de animais, incluindo porcos, gado, ratos, cachorros, ovinos e até em um leão. Já foi levantada a hipótese de que exista pelo menos um genótipo a mais que ainda não foi descrito e que seria responsável pela transmissão zoonótica entre cães e seres humanos. Esta hipótese levanta a polêmica questão de que os animais podem atuar como um reservatório para NoVs humanos. Apesar de nunca ter sido comprovada, autores sugerem que a epidemiologia do NoVs ainda é muito limitada quando se considera estudos desse tipo, não podendo ter certeza se realmente nunca ocorreu uma transmissão interespecífica (KOOPMANS, 2008; MARSHALL E BRUGGINK, 2011).

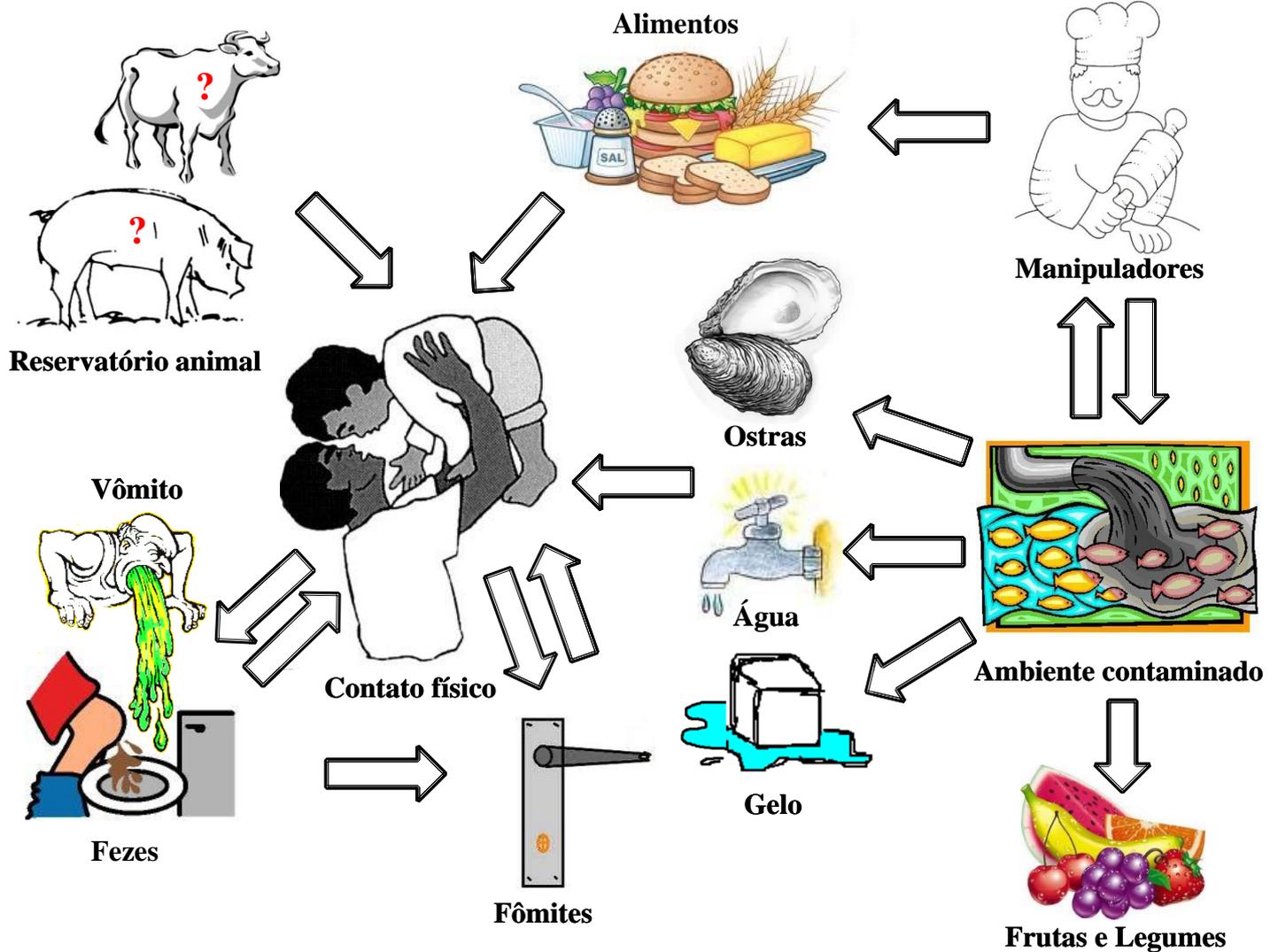


Figura 6. Ilustração das principais rotas de transmissão dos norovírus. Fluxograma criado com figuras obtidas do Google Imagens.

3.19 TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE

Não existe nenhuma vacina comercialmente disponível para a prevenção dos NoVs, assim como não há nenhuma medicação específica contra este vírus. Entretanto, recentemente foi lançado no mercado um medicamento antimicrobiano de amplo espectro com o nome comercial Annita[®] (nitazoxanida). Essa droga já está em utilização para o tratamento de várias parasitoses, tendo sido empregada para reduzir o tempo de duração de doença diarreica causada por RoVs e NoVs. Desta maneira, juntamente com as medidas sanitárias recomendadas para interromper a propagação da doença, o medicamento poderia contribuir para a redução da transmissão pessoa a pessoa, sobretudo em situações de surto. Vale ressaltar

que os médicos devem avaliar cada caso, considerando sua gravidade e circunstâncias envolvendo cada paciente, a fim de evitar o uso indiscriminado do medicamento em virtude dos seus fatores de risco (ROSSIGNOL E EL-GOHARY, 2006; CVE, 2010; SIDDIQ et al., 2011).

Contudo, de maneira geral para seu tratamento, devem-se seguir os procedimentos médicos básicos para quem apresenta quadro de gastroenterite aguda, o qual consiste em hidratação e reposição de eletrólitos, por meio de sais orais ou soro caseiro, e hidratação endovenosa nos casos mais graves. Não são indicados antibióticos e medicamentos para diminuir as contrações intestinais ou estancar a diarreia, pois podem piorar ou prolongar o quadro gastrointestinal. Evacuações muito frequentes e líquidas, dificuldades na hidratação, devido constantes episódios de vômitos, pele e boca seca e dificuldade em urinar, são indicações de que se deve procurar o serviço de saúde (BRASIL, 2010).

As principais medidas recomendadas para a prevenção e controle das infecções por NoVs estão descritas no quadro 3.

Boas práticas de higiene das mãos
<ol style="list-style-type: none"> 1) Lavar as mãos frequentemente com água e sabão, especialmente depois de ir ao banheiro, antes de se alimentar/preparar alimentos e na troca de fraldas de bebês. 2) Não tocar superfícies ou objetos infectados com vômitos ou fezes de pacientes com gastroenterites virais; evite levar a mão à própria boca quando em contato com pessoas doentes. 3) Recomenda-se o uso de álcool em gel para desinfetar as mãos após a lavagem com água e sabão.
Desinfetar superfícies contaminadas
<ol style="list-style-type: none"> 1) Lavar e desinfetar superfícies que tenham sido contaminadas com vômitos ou fezes de pessoas doentes, usando água/sabão e desinfecção com água sanitária. 2) Mantenha limpos e desinfetados os sanitários, especialmente após o uso por pessoas com diarreia.
Cuidados pessoais
<ol style="list-style-type: none"> 1) Pessoas com diarreia não devem retornar à escola ou trabalho até 24-72 horas após a cessação dos sintomas e, quando recuperados, devem lavar frequentemente as mãos. 2) Pessoas com diarreia ou plena recuperação não devem preparar alimentos que serão consumidos por outras pessoas, a fim de evitar contaminação.

<p>3) Crianças e adultos com diarreia ou plena recuperação não devem frequentar piscinas, pois, podem inadvertidamente (por defecação ou vômitos) contaminar essas águas e propagar a doença para outras pessoas.</p> <p>4) Recomenda-se a todos que frequentam piscinas e águas de recreação que tomem banho prévio em chuveiro ou façam higienização com ducha higiênica, após a evacuação, para evitar a contaminação das águas de recreação.</p>
<p>Medidas gerais de higiene aplicadas à transmissão por água e alimentos</p>
<p>1) Cuidados com frutas e verduras: devem ser bem lavadas e desinfetadas com hipoclorito a 2,5%.</p> <p>2) Cuidado com ostras e frutos do mar, ingeridos crus ou mal cozidos, e de origem desconhecida. A ingestão de alimentos bem cozidos e devidamente aquecidos é uma boa medida para se evitar diarreia devido a qualquer microrganismo.</p> <p>3) Em locais com suspeita de problemas ou acidentes no sistema de água, ferver a água a ser consumida. A água deve ser fervida por 5 a 10 minutos após ebulição.</p> <p>4) Cuidado com água mineral falsa e de fabricação clandestina.</p> <p>5) Cuidado com o gelo, “raspadinhas”, “sacolés”, sorvetes não industrializados, sucos e outros produtos de origem desconhecida.</p>
<p>Medidas complementares para prevenção de surtos em serviços de saúde</p>
<p>1) Observar os procedimentos gerais e precauções padrão já elaborados no controle de infecção hospitalar para se evitar as gastroenterites.</p> <p>2) Na sala de espera para atendimento médico, separar pacientes com gastroenterites dos que não estão afetados pela doença.</p> <p>3) Disponibilizar sanitários diferentes para grupos de doentes com gastroenterites dos que estão sem a doença. Os sanitários devem dispor de água e sabão líquido, toalhas de papel e álcool gel para a higiene das mãos.</p> <p>4) Instruir funcionários dos serviços sobre os cuidados de prevenção de gastroenterites no contato com pessoas doentes.</p> <p>5) Não admitir pacientes com outras patologias em enfermarias ou unidades com doentes acometidos por gastroenterites.</p>

Quadro 3. Principais medidas recomendadas para a prevenção e controle das infecções por norovírus. Fonte: BRASIL (2010).

3.20 VACINA

A vacinação contra agentes microbianos é a melhor estratégia custo-benefício para reduzir a morbidade e a mortalidade ocasionada por determinada doença. O desenvolvimento

de uma vacina, geralmente, é justificado baseado em dados clínicos e epidemiológicos de uma doença na população (ESTES et al., 2000).

Anos de estudos epidemiológicos geraram dados consistentes que reforçam a clara necessidade da produção de uma vacina contra o NoVs, que poderá beneficiar a população em geral, mas principalmente os grupos mais suscetíveis como crianças, idosos, militares em operação e pessoas imunocomprometidas (ESTES E HARDY, 1995).

Muitos são os desafios para o desenvolvimento da vacina, dentre os quais se podem citar: (1) o pouco conhecimento acerca da proteção imune do hospedeiro; (2) a necessidade de se considerar a imunidade da mucosa e o limitado conhecimento adquirido até o momento; (3) o fato de existirem vários genogrupos e genótipos de NoVs que infectam humanos e as evidências de que a infecção por certos tipos não confere proteção à infecção por outros; (4) a característica do vírus não ser cultivável e (5) não existirem modelos animais conhecidos. Esses fatores são obstáculos nas estratégias de concepção vacinal (ESTES et al., 2000).

Apesar das dificuldades, estudos vêm sendo realizados a fim de contribuir para a produção de uma vacina. Um exemplo interessante é o conceito de vacina comestível que apresenta resultados promissores com administração oral de NoVs recombinantes. A utilização dessas partículas recombinantes a partir de tabaco e tubérculos de batata apresentou resposta imune bem sucedida na mucosa de ratos e camundongos, dando suporte a viabilidade de uma vacina comestível (HAQ et al., 1995; MASON et al., 1996; TACKET et al., 2000).

Estudos envolvendo a partícula P dos NoVs (utilizada como antígeno de apresentação do vírus, o qual se liga a receptores dos antígenos do grupo sanguíneo ABO), têm apresentado resultados promissores. Estas partículas são consideradas interessantes para a produção de anticorpos e o desenvolvimento de uma vacina (TAN et al., 2011). Outras pesquisas visando a concepção de uma vacina mista contra RVs e NoVs envolvendo VLPs (*Virus-like particles*) da proteína do capsídeo de cepas GII.4 de NoVs, juntamente com recombinantes da proteína

VP6 de RVs, sugerem que a utilização destes dois componentes pode representar uma estratégia viável para a imunização contra estes dois enteropatógenos virais (BLAZEVIC et al., 2011).

É bom destacar, que a imunogenicidade e o real potencial de uma vacina só podem ser completamente avaliadas quando aplicadas em seres humanos; contudo, as recentes pesquisas são fundamentais, já que a elaboração de uma vacina contra NoVs só poderá se concretizar a partir do maior entendimento da estrutura atômica do vírus, de sua montagem no hospedeiro e das regiões do capsídeo que induzem respostas anticorpo-específico, especialmente por via oral (PRASAD et al., 1999; ESTES et al., 2000).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as infecções por NoVs em crianças internadas com quadro de gastroenterite aguda no município de Belém, Pará.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a frequência com que os NoVs ocorrem nos quadros de gastroenterite;
2. Avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia do exame sorológico na detecção dos casos de norovirose;
3. Demonstrar a diversidade de cepas circulantes associadas aos casos de gastroenterite;
4. Definir os sinais e sintomas clínicos apresentados pelos menores infectados e verificar a faixa etária mais acometida por esse vírus;
5. Determinar a sazonalidade desses patógenos e correlacionar esses dados com os fatores climáticos observados;
6. Comparar a sazonalidade observada para este vírus com aquela demonstrada pelos RoVs no mesmo período de estudo.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.1 PACIENTES E ESPÉCIMES CLÍNICOS

As amostras clínicas inseridas nesta pesquisa foram provenientes de um estudo caso-controle, cujo objetivo foi avaliar a efetividade da vacina para RoVs, implementada no Brasil em março de 2006, com a introdução de duas doses da vacina monovalente Rotarix™ (VORH-GlaxoSmithKline Biological [GSK®]) no calendário nacional de vacinação.

Essa investigação envolveu quatro clínicas/hospitais pediátricos (as) da cidade de Belém, das quais, a com maior número de hospitalizações (Clínica Pediátrica do Pará) foi inserida no presente estudo envolvendo os NoVs.

Foram incluídas na pesquisa crianças internadas com quadro de gastroenterite grave, caracterizada por 3 ou mais episódios de diarreia líquida ou pastosa no período de 24 horas, que tenham iniciado o processo diarreico em menos de 14 dias, com ou sem ocorrência de vômito, e que exigiram internação por pelo menos uma noite. A maioria das crianças havia recebido pelo menos duas doses da vacina para RoVs e apresentaram-se idade-elegíveis (possuíam mais de 12 semanas de vida, sendo menores de 5 anos de idade e nascidas a partir de 6 de março de 2006).

A coleta das amostras fecais ocorreu de maio de 2008 a abril de 2011, perfazendo 3 anos de vigilância. Foram incluídas para pesquisa dos NoVs, o total de aproximadamente 20% dos espécimes que apresentaram resultado negativo para RoVs quando testados pelo EIA. Essa seleção foi realizada de maneira randômica, mediante sorteio, utilizando as ferramentas de estatística aleatória sem reposição do programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007) a fim de evitar viés na escolha das mesmas. Durante os 3 anos de vigilância foram coletadas 2276 amostras fecais viáveis de serem incluídas neste estudo. Adotando-se um nível de confiança de 95%, a um erro amostral de 4%, foram selecionadas 483 amostras para serem testadas quanto a presença dos NoVs.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo caracteriza-se como sendo de cunho analítico, visto estar subordinado a uma ou mais questões científicas, as “hipóteses” que relacionam uma suposta “causa” a um dado “efeito”. Estudos analíticos apresentam um grupo controle, formado simultaneamente ao grupo de estudo para efeito de comparação dos resultados. A presente pesquisa constitui-se como sendo do tipo transversal, visto a maneira como tais grupos (estudo e controle) são formados. Nesta modalidade de investigação, somente na análise dos resultados é que se torna possível identificar os indivíduos “expostos” (grupo de estudo - doentes) e “não expostos” (grupo controle - sadios), a fim de se realizar as análises pertinentes (PEREIRA, 1995).

5.3 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

A utilização das amostras provenientes dessa clínica foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do Instituto Evandro Chagas (CEP/IEC) a fim de serem testadas quanto a presença dos RoVs sob o registro CAAE: 0003.0.072.000-08. Conforme preconiza a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, o atual estudo envolvendo os NoVs também foi submetido ao CEP/IEC, sendo aprovado sob o nº CAAE: 0024.0.072.000-10 (anexos A e B).

Por se tratar de um estudo cuja execução envolve manipulação de material biológico estocado no acervo do IEC, sua execução apresentou risco mínimo aos pacientes envolvidos nesta pesquisa. Vale ressaltar, que a manipulação dos espécimes fecais foi conduzida conforme o padrão de biossegurança recomendado para este tipo de amostra.

5.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A figura 7 apresenta um fluxograma resumido dos procedimentos realizados para a detecção e caracterização molecular dos NoVs.

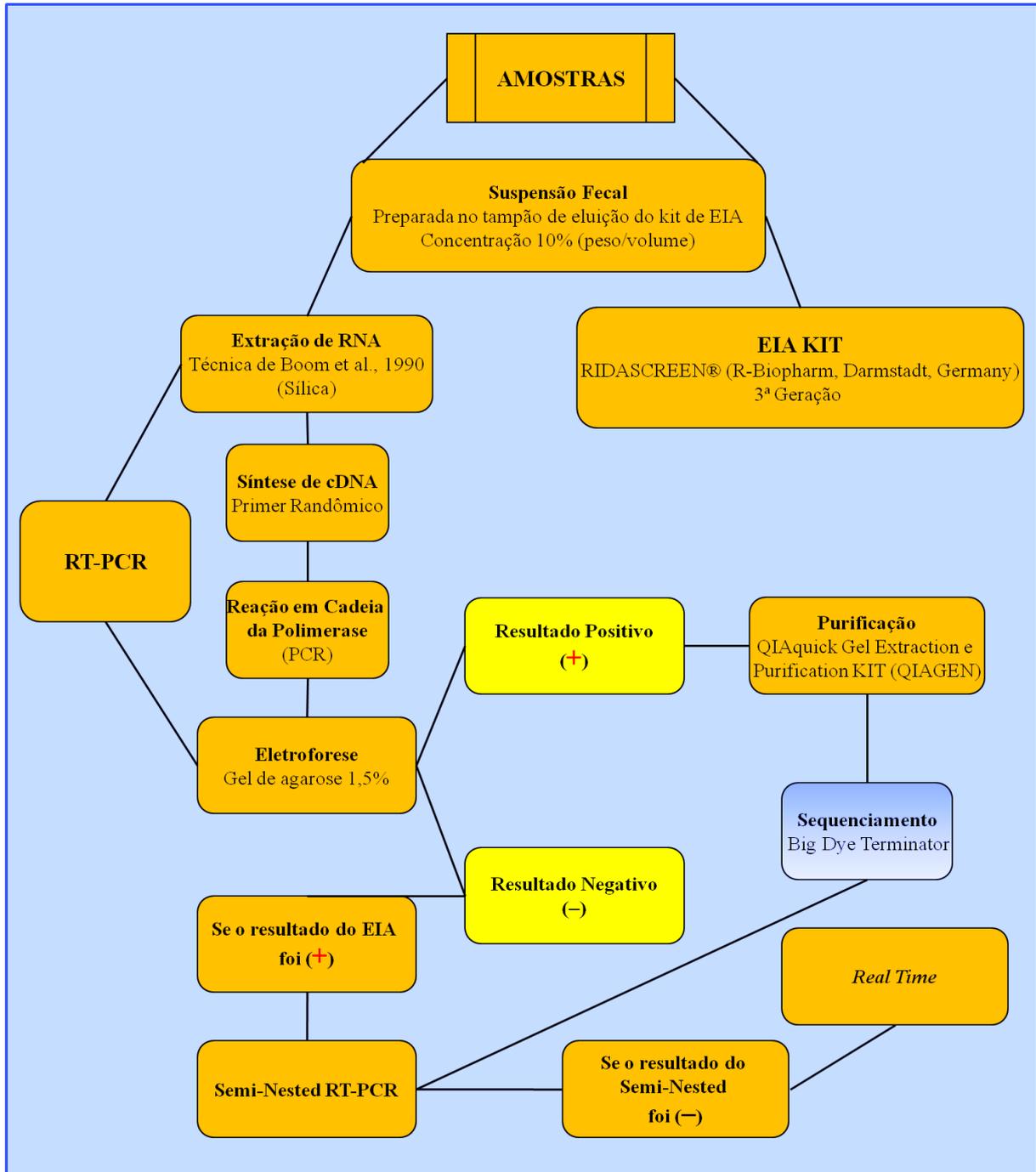


Figura 7. Fluxograma ilustrando os procedimentos para detecção e caracterização molecular de norovírus a partir das amostras fecais de crianças internadas com quadro de gastroenterite no município de Belém, Pará.

O modo de preparo de todas as soluções que foram utilizadas nos diferentes procedimentos laboratoriais está listado no apêndice A.

5.4.1 Ensaio imunoenzimático

Todas as amostras foram pesquisadas quanto a presença de antígenos de NoVs, utilizando o kit comercial RIDASCREEN® Norovirus EIA (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) de 3ª geração, conforme instruções do fabricante. Este EIA é baseado em anticorpos monoclonais contra antígenos específicos dos genogrupos I e II de NoVs que se encontram fixados na superfície dos orifícios da microplaca, para capturar o antígeno presente nas amostras fecais.

Resumidamente, 100 µl de cada suspensão fecal (1:10 v/v) feita no tampão do kit, foi adicionada a um orifício, juntamente com o controle positivo e negativo. Também 100 µl de anticorpo conjugado com biotina (conjugado 1) foi acrescentado em todos os orifícios. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, os mesmos foram lavados cinco vezes com 300 µl de tampão de lavagem. Duas gotas (100µl) do conjugado estreptavidina-peroxidase (conjugado 2) foram adicionados em cada orifício e após 30 minutos de incubação, cinco lavagens foram realizadas. A fixação do conjugado específico foi determinada pela adição de 100 µl do substrato cromatogênico seguido de incubação de 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. A reação foi interrompida com a adição de 50 µl do reagente bloqueador e a absorbância foi medida em espectrofotômetro utilizando filtro de 450 nm. As amostras que demonstraram um valor de absorbância igual ou maior do que o valor do “cut-off” ([valor de absorbância do controle negativo + 0,150] + 10%) foram consideradas positivas.

5.4.2 Suspensão fecal a 10%

Inicialmente, foram preparadas suspensões fecais a 10% no tampão de eluição do kit de EIA conforme instruções do fabricante. Quando a mesma esgotava, preparava-se nova suspensão, desta vez utilizando solução salina Tris/HCl/Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2. Para cada amostra, 100 mg de fezes (aproximadamente o tamanho de uma ervilha) foi adicionado em 1ml deste tampão. Após homogeneização em aparelho do tipo vórtex por 10 segundos, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante coletado e estocado a -20°C até o momento da análise.

5.4.3 Extração do RNA viral

As amostras testadas pelo EIA foram submetidas à extração do RNA viral pelo método da sílica (Isotiocianato de Guanidina) conforme descrito por Boom et al. (1990), com algumas modificações realizadas por Cardoso et al. (2002).

Adicionou-se 300 µl de suspensão fecal a 10% em 800 µl de tampão L6 e 20 µl de Proteinase K Fungal (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), com subsequente homogeneização em vórtex por 10 segundos e incubação a 56°C por 10 min. Acrescentou-se 200 µl de etanol absoluto a 96% (gelado) e 20 µl de sílica, se homogeneizou em vórtex por 10 segundos e colocou-se em plataforma horizontal a 180 rpm por 20 minutos. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 40 segundos e se descartou o sobrenadante em solução de NaOH 10N. Lavou-se o sedimento com 500 µl de tampão L2, 500 µl de etanol 70% (gelado) e 500 µl de acetona PA gelada, intercalando cada lavagem com homogeneização em vórtex, centrifugação a 14.000 rpm por 40 segundos e descarte do sobrenadante. Secou-se a sílica em banho-maria a 56 °C por 15 minutos com tampa dos microtubos abertas. Ressuspendeu-se a sílica em 60 µl de tampão AE e 1 µl de inibidor de RNase (RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor [cloned] 40U/µl - Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) e após homogeneização em vórtex por 10

segundos, incubou-se a 56 °C por 15 minutos. Por fim, se homogeneizou em vórtex por 10 segundos e centrifugou-se a 14.000 rpm por 4 minutos. Coletou-se 45 µl do sobrenadante e estocou-se a -20 °C.

5.4.4 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a obtenção do cDNA foi realizada reação de transcrição reversa com iniciador randômico (9 A₂₆₀ units/µl, 3 mM Tris-HCl (pH 7,0), 0,2 mM EDTA - Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) e a enzima transcriptase reversa (Superscript™ II RNase H Reverse, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA).

Adicionou-se 1 µl de dimetil sulfoxido (DMSO) a 6 µl de RNA extraído e se incubou a 97°C por 7 minutos. Colocou-se em banho de gelo por 2 minutos e se adicionou 18 µl da mistura (mix) de reagentes descritos no quadro 4. Incubou-se a 42°C por 1 hora e 95°C por 10 minutos em termociclador automático. Estocou-se o produto a -20°C até o momento da sua amplificação.

REAGENTE	MARCA	CONC ^a /REAÇÃO	VOLUME/REAÇÃO
H ₂ O livre de DNAase / RNAase	GIBCO	-	10,75 µl
DNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	Invitrogen®	200 µM	2,0 µl
Tampão 10X Buffer sem MgCl ₂	Biotools®	1 X	2,5 µl
MgCl ₂	Biotools®	2,5 mM	1,25 µl
pd(N) ₆	Invitrogen®	0,12 µg	1,0 µl
Superscript™ II Reverse transcriptase	Invitrogen®	10 U	0,5 µl

^a Concentração

Quadro 4. Concentrações e volumes, por reação, dos reagentes utilizados na 1^a mix para a síntese do cDNA por transcrição reversa do RNA viral extraído.

5.4.5 Reação em cadeia da Polimerase (PCR Convencional)

Para a detecção dos NoVs foi realizada a amplificação do cDNA por meio da técnica de PCR convencional utilizando-se dois conjuntos de iniciadores, Mon 432/434 e Mon 431/433 que codificam parcialmente a extremidade 3' da região B da ORF 1 (que apresenta o gene que codifica a RdRp). Esses iniciadores são específicos para detectar os genogrupos GI e GII de NoVs, gerando um *amplicon* de 213 pares de bases (pb) (ANDERSON et al., 2001).

Adicionou-se 10 µl de cDNA a 15 µl da segunda mix de reagentes (quadro 5). Foram observadas as seguintes condições de amplificação para esses iniciadores: desnaturação por 3 minutos a 94°C, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 50°C, 30 segundos a 60°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

REAGENTE	MARCA	CONC ^a /REAÇÃO	VOLUME/REAÇÃO
H ₂ O livre de DNAase / RNAase	GIBCO	-	9,1 µl
DNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	Invitrogen [®]	200 µM	2,0 µl
Tampão 10X Buffer sem MgCl ₂	Biotools [®]	1 X	2,5 µl
MgCl ₂	Biotools [®]	1,6 mM	0,8 µl
Mon 431 - Mon 432 - Mon 433 - Mon 434	Invitrogen [®]	25 pmol	0,3 µl
Taq DNA polimerase	Biotools [®]	1,5 U	0,3 µl

^a Concentração

Quadro 5. Concentrações e volumes, por reação, dos reagentes utilizados na 2^a mix para a amplificação do cDNA pela técnica de PCR.

5.4.6 Semi-nested RT-PCR

As amostras que apresentaram resultado positivo no EIA e negativo na RT-PCR foram submetidas à técnica de semi-nested RT-PCR que consiste na amplificação parcial do genoma de interesse a partir de um produto previamente amplificado, o que atribui a essa metodologia mais sensibilidade do que aquela observada na RT-PCR convencional.

Para a transcrição/amplificação do RNA/cDNA foram utilizados os iniciadores JV13I e JV12Y que codificam parcialmente a região da RdRp e são específicos para detectar os genogrupos GI e GII de NoVs, gerando um fragmento de DNA de 327 pb (VENNEMA et al., 2002).

Adicionou-se 2 µl de RNA a 8 µl da mix de reagentes descrita no quadro 6. Foram observadas as seguintes condições de amplificação para esses iniciadores: transcrição reversa por 1 hora a 42°C; desnaturação por 3 minutos a 94°C; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto e 30 segundos a 37°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

REAGENTE	MARCA	CONC ^a /REAÇÃO	VOLUME/REAÇÃO
H ₂ O livre de DNAase / RNAase	GIBCO	-	5,15 µl
DNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	Invitrogen [®]	200 µM	0,5 µl
Tampão 10X Buffer sem MgCl ₂	Biotools [®]	1 X	1,0 µl
MgCl ₂	Biotools [®]	1,5 mM	0,3 µl
JV13I	Bioneer [®]	15 pmol	0,375 µl
JV12Y	Bioneer [®]	15 pmol	0,375 µl
Superscript [™] II Reverse Transcriptase	Invitrogen [®]	2 U	0,1 µl
Taq DNA polimerase	Biotools [®]	2 U	0,2 µl

^a Concentração

Quadro 6. Concentrações e volumes, por reação, dos reagentes utilizados na 1^a etapa da técnica de semi-nested RT-PCR.

Posteriormente, foram realizadas separadamente as reações de semi-nested PCR para os genogrupos I e II de NoVs, por meio da análise parcial da região da RdRp. Para a detecção de GI foi utilizado o iniciador JV13I já empregado na primeira reação como sequencia nucleotídica anti-sense e o G1 como sense, produzindo um fragmento de 187 pb (GREEN et al., 1998). Para a detecção do genogrupo II foi utilizado o iniciador JV12Y já presente na

primeira reação como sequencia nucleotídica sense e o NoroII-R como anti-sense gerando um fragmento de 236 pb. O oligonucleotídeo NoroII-R foi baseado no iniciador NI descrito inicialmente por Green e colaboradores (1998), contudo usado como iniciador sense, diferentemente do presente estudo (figura 8).

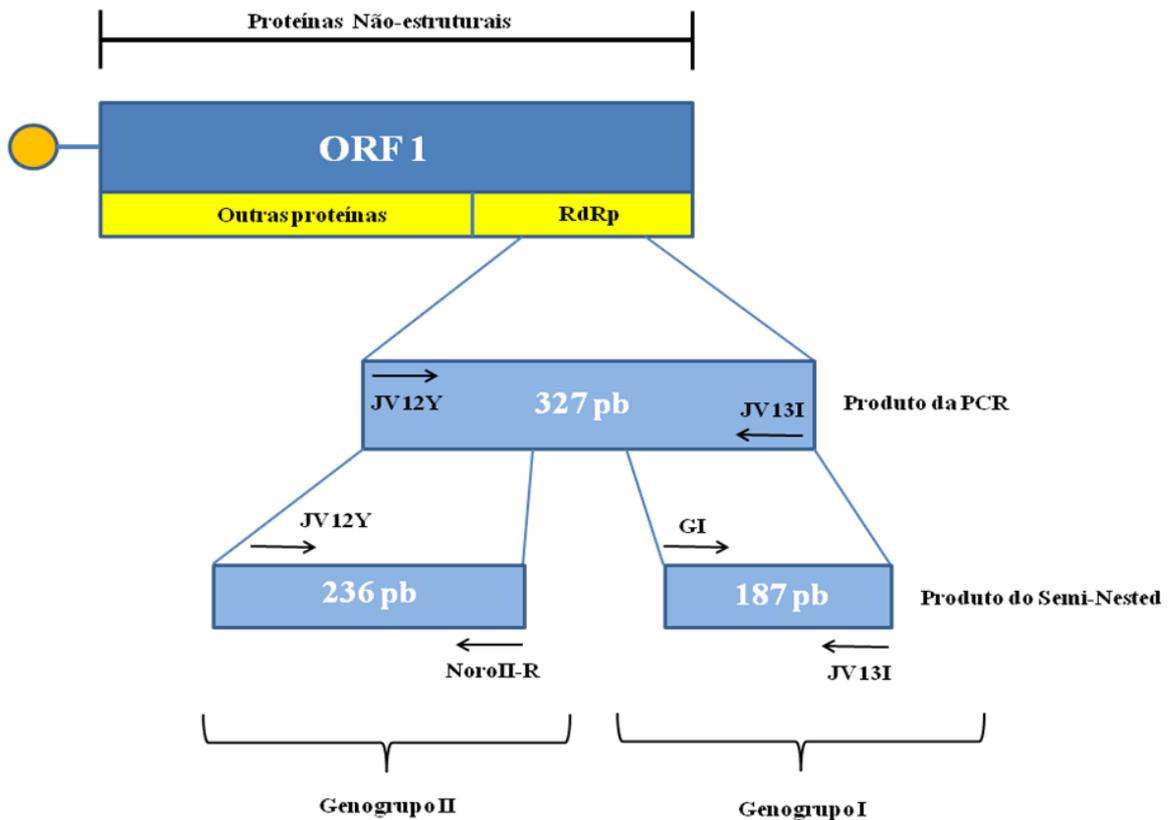


Figura 8. Esquema ilustrando a reação de semi-nested RT-PCR. Faixa amarela corresponde à região do genoma que codifica as proteínas não estruturais. Faixa azul escuro: apresenta a primeira matriz de leitura aberta. Faixas azuis claro: Fragmentos amplificados nas reações. Setas: Oligonucleotídeos iniciadores de cadeia. Círculo laranja: Proteína VPg.

Em ambas as reações de semi-nested RT-PCR, adicionou-se 1 µl do produto obtido na primeira etapa de amplificação (diluído 1:100 em H₂O livre de DNAase / RNAase) a 11,5 µl da mix de reagentes descrita no quadro 7. Foram observadas as seguintes condições de amplificação: desnaturação por 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto e 30 segundos a 37°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

REAGENTE		MARCA	CONC ^a /REAÇÃO	VOLUME/REAÇÃO
H ₂ O livre de DNAase / RNAase		GIBCO	-	8,54 µl
DNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP		Invitrogen [®]	250 µM	0,5 µl
Tampão 10X Buffer sem MgCl ₂		Biotools [®]	1 X	1,25 µl
MgCl ₂		Biotools [®]	2,0 mM	0,5 µl
GI	JV13I	Bioneer [®]	12,5 pmol	0,325 µl
	G1	Bioneer [®]	12,5 pmol	0,325 µl
GII	JV12Y	Bioneer [®]	12,5 pmol	0,325 µl
	NoroII-R	Bioneer [®]	12,5 pmol	0,325 µl
Taq DNA polimerase		Biotools [®]	0,6 U	0,06 µl

^a Concentração

Quadro 7. Concentrações e volumes, por reação, dos reagentes utilizados nas reações de semi-nested PCR para detecção do genótipo GI ou GII de norovírus.

Todas as condições de ciclagem e concentração/volume observadas nesta técnica de semi-nested RT-PCR foram adaptadas de Boxman et al. (2006).

5.4.7 PCR em tempo real (*Real Time*)

As amostras que apresentaram resultado positivo no EIA e negativo na RT-PCR convencional e na semi-nested RT-PCR foram submetidas à técnica de PCR em tempo real que consiste na amplificação parcial do genoma de interesse, a partir do uso de iniciadores e sondas que emitem fluorescência no momento em que ocorre a amplificação de uma sequência nucleotídica alvo-específica.

Para a amplificação do DNA foram utilizados os iniciadores COG2-F e COG2-R e a sonda fluorescente RING2 (marcada com o fluoróforo FAM) que codificam parcialmente a

região da junção ORF1-ORF2 e são específicos para detectar o genogrupo II de NoVs, gerando um fragmento de DNA de 98 pb (KAGEYAMA et al., 2003).

Adicionou-se 3 µl de cDNA a 12 µl da mix de reagentes descrita no quadro 8. Foram observadas as seguintes condições de amplificação no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems): desnaturação por 10 minutos a 95°C; 45 ciclos de 20 segundos a 94°C e 1 minuto a 56°C, seguido de uma extensão final de 5 minutos a 95°C. O software utilizado para análise durante as ciclagens foi o 7500 Software v 2.0.5 (Applied Biosystems).

REAGENTE	MARCA	CONC ^a	VOLUME/REAÇÃO
H2O livre de DNAase / RNAase	GIBCO	-	3,6 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	Life Technologies	2x	7,5 µl
COG2-F	Life Technologies	400 µM	0,3 µl
COG2-R	Life Technologies	400 µM	0,3 µl
Sonda RING2-TP	Life Technologies	200 µM	0,3 µl

^a Concentração

Quadro 8. Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR em tempo real para detecção do genogrupo II de norovírus.

Todas as condições de ciclagem e concentração/volume observadas nesta técnica foram adaptadas de Pang et al. (2005).

5.4.8 Análise dos produtos amplificados

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose ultra-pura (Invitrogen[®]) a 1,5%, corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Dois microlitros do corante azul de bromofenol Blue/Orange Loading Dye, 6X (0,03% azul de bromofenol, 0,03% de Xileno Cianol FF, 0,4% de Orange G, 15% Ficoll[®] 400, 10 mM Tris-

HCl [pH 7,5] e 50 mM EDTA [pH 8,0], Promega, USA) foram adicionados a 10 µl do produto da PCR. Para identificar o tamanho do *amplicon*, se utilizou um padrão de peso molecular DNA Ladder 100 ou 123 pb (1 µg/µl) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

O gel foi submerso em solução tampão TBE 1X e submetido à eletroforese horizontal a 100V e 400mA por tempo variável, dependendo do tamanho da cuba de eletroforese utilizada. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada no aparelho de fotodocumentação GEL DOC 1000 (Vilber Lourmat, France) com auxílio do programa BioCapt.

Controles positivos e negativos foram inseridos em todas as etapas de procedimento desde a extração do RNA viral até a RT-PCR para o controle e garantia da qualidade dos resultados.

5.4.9 Sequenciamento parcial do genoma viral

5.4.9.1 Purificação do DNA

As amostras foram purificadas de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações (apêndices B e C), utilizando os kits comerciais QIAquick® Gel Extraction Kit ou QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN), dependendo do padrão de bandas apresentado (presença ou não de bandas espúrias). Dois microlitros do corante azul de bromofenol Blue/Orange Loading Dye, 6X (0,03% azul de bromofenol, 0,03% de Xileno Cianol FF, 0,4% de Orange G, 15% Ficoll® 400, 10 mM Tris-HCl [pH 7,5] e 50 mM EDTA [pH 8,0], Promega, USA) foram adicionados a 4 µl do produto obtido na purificação e então aplicados em gel de agarose a 2% corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), juntamente com o marcador molecular DNA Low Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A quantificação de DNA foi realizada em nanogramas pela comparação da intensidade de brilho das bandas reveladas em relação às do marcador.

5.4.9.2 Reação de sequenciamento

Após a purificação, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento utilizando os mesmos oligonucleotídeos descritos anteriormente, que codificam a RdRp. Aquelas amostras, cujo resultado do sequenciamento por esta região demonstrou classificação indefinida, conforme afirma BULL et al. (2007), foram submetidas à nova reação de sequenciamento utilizando os iniciadores degenerados Cap C/Cap D1/Cap D3 para a caracterização molecular dos genogrupos II. Esses iniciadores codificam parcialmente a extremidade 3' da região D da ORF 2 (gene que codifica a proteína do capsídeo viral), considerada uma região mais apropriada para a caracterização molecular dos NoVs (ZHENG et al., 2006). As condições de termociclagem para a amplificação por esses oligonucleotídeos foram as mesmas descritas por Vinjé et al. (2004).

O quadro 9 demonstra as concentrações e volumes dos reagentes na reação, na qual foram observadas as seguintes condições de termociclagem: desnaturação por 30 segundos a 96°C; hibridização por 15 segundos a 50°C e extensão por 3 minutos a 60°C durante 25 ciclos. Já o quadro 10 apresenta a descrição dos iniciadores de cadeia utilizados para detecção/caracterização molecular dos NoVs, com suas sequências, localização no genoma e tamanho do fragmento.

REAGENTE	VOLUME
DNA (≈ 25 ng)	0,5 - 5 µl
Tampão de sequenciamento (5X)	1 µl
Big Dye kit (v. 3.1) (Applied Biosystems, Foster City, USA)	2 µl
Iniciador (4 pmol)	2 µl
H ₂ O livre de DNAase/RNAase - q.s.p.	10 µl

Quadro 9. Reagentes utilizados na reação de sequenciamento para caracterização molecular dos norovírus.

Genogrupo	Iniciadores/ Sonda	Sequência 5'→3'	Posição no genoma	Amplicons (pb)	Finalidade	Região
GII	COG2-F (+)	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	5003	98	PCR Tempo Real	Junção ORF1/ ORF2
	COG2-R (-)	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	5100			
	RING2-TP (Sonda) (+)	FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-TAMRA	5048			
GI	G1 (+)	TCN GAA ATG GAT GTT GG	(4691–4707)	187	Semi-Nested RT-PCR & Sequenciamento	ORF 1
	JV13I (-)	TCA TCA TCA CCA TAG AAI GAG	(4858–4878) (4585–4605)	327		
GII	JV12Y (+)	ATA CCA CTA TGA TGC AGA YTA	(4552–4572) (4279–4299)	327		
	NoroII-R (-)	AGC CAG TGG GCG ATG GAA TTC	(4495–4515)	236		
GI	Mon 432 (+)	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	(5093–5114)	213		
	Mon 434 (-)	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	(5285–5305)			
GII	Mon 431 (+)	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	(5093–5114)			
	Mon 433 (-)	GGA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	(5285–5305)			
GII	Cap C (-)	CCT TYC CAK WTC CCA YGG	(6667–6684)	253	Capsídeo (Sequenciamento)	ORF 2
	Cap D3(+)	TGY CTY ITI CCH CAR GAA TGG	(6432–6452)			
	Cap D1(+)	TGT CTR STC CCC CAG GAA TG	(6432–6451)			

I: inosina; R: purina (A/G); Y: pirimidina (C/T); S: C/G; B: C/G/T; N: A/C/G/T.

Quadro 10. Iniciadores de cadeia utilizados na reação de PCR convencional, semi-nested RT-PCR e PCR em tempo real para amplificação parcial do genoma dos norovírus com a finalidade de detecção e/ou caracterização molecular.

Após a reação de sequenciamento foi realizada uma etapa de precipitação com isopropanol a 65%. A placa foi agitada levemente em aparelho vórtex, incubada por 15 minutos e centrifugada por 45 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente (22°C). Foi então removido o isopropanol por rápida inversão da mesma. Posteriormente, foi adicionada uma etapa de etanol a 70%, a placa foi novamente agitada em aparelho vórtex e centrifugada por 20 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente. Foi então removido o etanol por rápida inversão da mesma e aplicados dois pulsos na centrifuga com a placa invertida em papel

absorvente. O *pellet* foi seco a 60°C por 5 minutos em termociclador. Uma terceira etapa foi realizada para ressuspender o *pellet* em 10 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, England), seguida de desnaturação por 5 minutos a 95°C e choque térmico em gelo por 3 minutos.

Por fim, o sequenciamento parcial do genoma foi realizado por eletroforese capilar no aparelho ABI Prism 3130XL DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

5.4.9.3 Dendograma de similaridade

As seqüências obtidas foram alinhadas e editadas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (v.7.0.9.1), sendo posteriormente comparadas a outras seqüências armazenadas no banco de genes (*GenBank - National Center for Biotechnology Information, US-[www.ncbi.nlm.nih.gov]*) utilizando o programa BLAST.

Os dendogramas das seqüências obtidas foram montados no programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011), com distância genética calculada pelo modelo Kimura 2-parâmetros (nucleotídeo), utilizando o algoritmo *Neighbor-Joining* e empregando o teste de confiabilidade não paramétrico de *bootstrap* de 2000 réplicas. Com os resultados obtidos, poder-se-á verificar a diversidade genética desses vírus no período de estudo.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O universo amostral necessário para a pesquisa foi estimado com o auxílio da calculadora on-line para cálculos amostrais (SANTOS, 2010). As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007), Gretl 1.9.5 e MINITAB 14.

O teste do crivo (*Screening test*) foi realizado para analisar a sensibilidade e a especificidade dos resultados obtidos por EIA comparado com a RT-PCR. O teste de Kappa

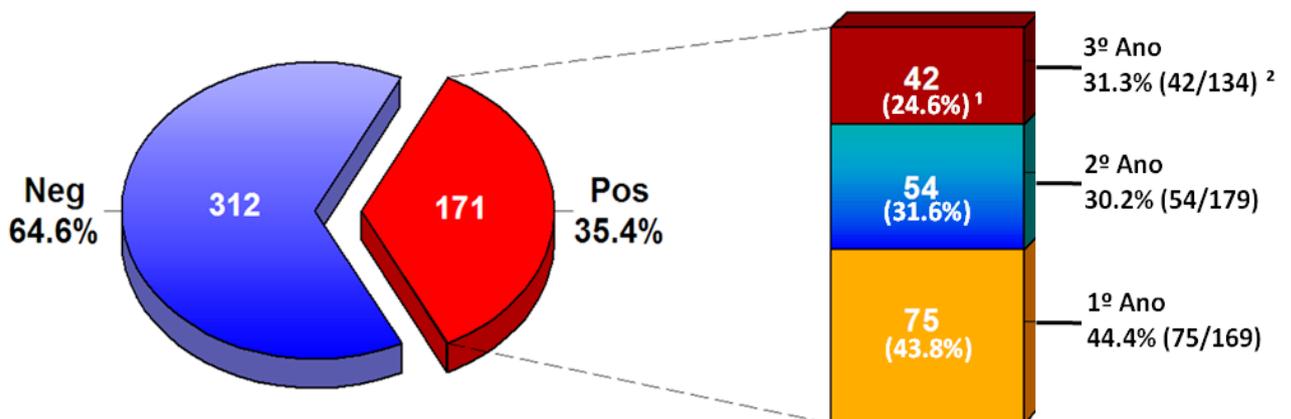
foi utilizado para verificar a reprodutibilidade do EIA. O *Odds Ratio* (OD) foi empregado para avaliar a significância estatística entre as faixas etárias das crianças infectadas. O teste de regressão linear múltipla foi aplicado para verificar a correlação entre as taxas de positividade e os parâmetros climáticos. Foi empregado o teste de regressão logística simples para analisar os sinais e sintomas das crianças acometidas pelo patógeno, bem como verificar se houve associação das infecções respiratórias com a duração/número de casos diarreicos e quantidade de episódios de vômitos nos casos positivos para NoVs. O teste de qui-quadrado foi utilizado para ponderar a duração e o número de episódios diarreicos por dia; e o teste G para avaliar o número de casos de vômito no período de estudo. Foi verificado se houve alguma associação entre o genótipo infectante e o número de episódios diarreicos, duração da diarreia e o número de episódios de vômito. Para tal, foi verificado se as amostras apresentavam distribuição normal pelo teste de Lilliefors, sendo que em caso negativo, foi empregado o teste U (Mann-Whitney).

A fim de monitorar o percentual mensal de positividade em função do tempo, observado para os NoVs nos três anos de vigilância, foi empregado o gráfico de controle de séries temporais. Este gráfico é uma ferramenta da técnica estatística Controle Estatístico da Qualidade e para sua construção, fez-se necessária a técnica de Séries Temporais conforme descrito por Morettin e Tolo (2004), que avaliou o modelo estatístico mais adequado para esses dados. No entanto, para sua construção, tornou-se imprescindível verificar se os dados possuíam distribuição normal e para isto, foi utilizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, em que as hipóteses testadas foram: H_0 : os dados seguem distribuição normal; H_1 : os dados não seguem distribuição normal. Em todos os tratamentos, diferenças estatisticamente significativas foram expressas por valores de $p \leq 0.05$. Os gráficos apresentados neste trabalho foram produzidos no programa Harvard Graphics (v.98.02), Microsoft Office Excel 2007, BioEstat 5.0 ou CorelDraw X3.

6 RESULTADOS

6.1 DETECÇÃO DE NOROVÍRUS

No período de maio/2008 a abril/2011, a positividade obtida para NoVs por EIA e/ou RT-PCR foi de 35,4% (171/483) (figura 9). Os resultados observados por estas duas técnicas estão explicitados na tabela 1.



¹ Percentual de positividade calculado em relação ao total de amostras positivas do estudo.

² Percentual de positividade calculado em relação ao total de amostras positivas obtidas por ano.

Figura 9. Detecção de norovírus por EIA e/ou RT-PCR em 483 espécimes fecais coletados de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda em Belém-Pará, entre maio/2008 e abril/2011.

Tabela 1 – Comparação dos resultados obtidos por EIA e/ou RT-PCR em 483 espécimes fecais coletados de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda em Belém-Pará, entre maio/2008 e abril/2011.

EIA	RT-PCR		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
Positivo	128	22	150 (31%)
Negativo	21	312	333
Total	149 (30.8%)	334	483

6.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS MÉTODOS DE DETECÇÃO (EIA E RT-PCR)

Adotando-se a RT-PCR como o método de referência, o EIA apresentou uma sensibilidade de 85,9% e uma especificidade de 93,4%. Contudo, quando comparadas as sensibilidades obtidas no EIA (87,7%) e na RT-PCR (87,1%), utilizando como “padrão ouro” a somatória dos resultados obtidos por ambas as metodologias, ficou demonstrado que não houve diferenças expressivas entre as duas técnicas (figura 10).

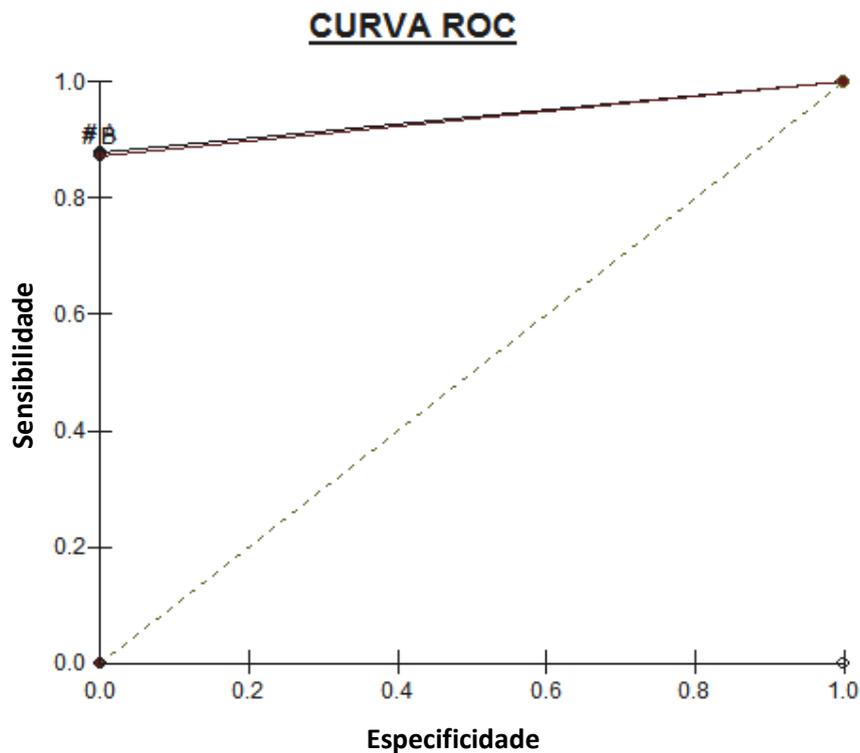


Figura 10. Curva ROC demonstrando a diferença entre as sensibilidades observadas no EIA e na RT-PCR, utilizando como “padrão ouro” a somatória dos resultados obtidos por ambas as metodologias.

Foi observada uma concordância de 91,1% entre as duas metodologias utilizadas, com uma excelente reprodutibilidade entre ambas ($Kappa = 0.8$, $p < 0.0001$). Contudo, das 171 amostras positivas, 12,8% (22/171) apresentaram positividade apenas quando testadas pelo EIA. Nestas amostras, foi realizado o teste de semi-nested RT-PCR, das quais 63,6% (14/22) confirmaram a positividade obtida no EIA. As amostras negativas na semi-nested RT-PCR

foram submetidas a PCR em tempo real, considerada a técnica mais sensível de detecção, sendo que 75% (6/8) apresentaram positividade (tabela 2).

Tabela 2 – Detecção de norovírus em 483 amostras coletadas de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda em Belém-Pará, entre maio/2008 e abril/2011, de acordo com a metodologia de diagnóstico utilizada.

EIA	RT-PCR	Nº espécimes	Semi-nested (+)	PCR Tempo Real (+)	Sequenciamento	
					Polimerase	Capsídeo
+	+	128	---	---	35 (GII.4d) 2 (GII.b) 4 (GII.7)	1 (GII.3)
+	-	22	14 (63,6%) ¹	6 (75%) ²	5 (GII.4d) 4 (GII.b)	4 (GII.3)
-	+	21	---	---	2 (GII.4d)	---
-	-	312	---	---	---	---
Total		483	14	6	52	5

¹ Foram testadas 22 amostras por esta técnica.

² Foram testadas 8 amostras por esta técnica.

Quando se considerou os resultados obtidos pela semi-nested RT-PCR e PCR em tempo real, os valores de sensibilidade e especificidade do EIA aumentaram para 87,6% e 99,4%, respectivamente.

6.3 GENOTIPAGEM

Um total de 28,8% (43/149) das amostras positivas pela RT-PCR da região da RdRp foi submetido à reação de sequenciamento nucleotídico, as quais 86% (37/43) foram classificadas como GII.4d, 9,3% (4/43) como GII.7 e 4,6% (2/43) como GII.b (figura 11).



Figura 11. Dendrograma demonstrando a classificação genética das amostras positivas para norovírus, detectadas pela RT-PCR convencional (região B – 213 pb), em fezes de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda entre maio/2008 e abril/2011 em Belém-Pará. Os criptogramas representando as amostras deste estudo estão organizados da seguinte maneira: local de estudo (Pará) / código da amostra / país de coleta (Brasil) / mês-ano de coleta.

Das 63,6% (14/22) amostras com resultado positivo por EIA e que foram confirmados pela técnica de semi-nested RT-PCR, 64,3% (9/14) foram submetidas à reação de sequenciamento nucleotídico da região da RdRp, utilizando os mesmos iniciadores da primeira etapa da reação de semi-nested RT-PCR, das quais 55,6% (5/9) foram classificadas como GII-4d e 44,4% (4/9) como GII.b (figura 12).

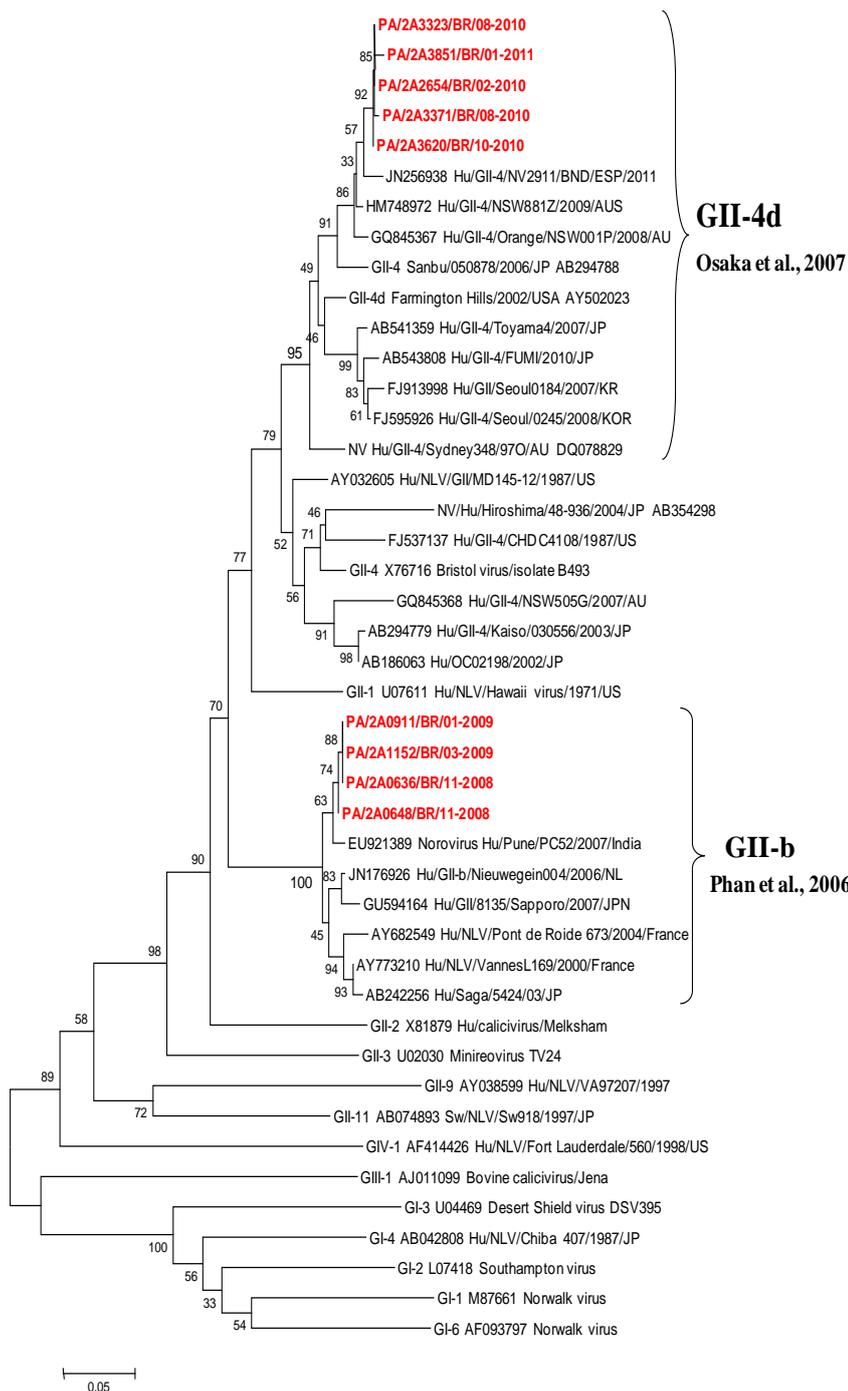


Figura 12. Dendrograma demonstrando a classificação genética das amostras positivas para norovírus, detectadas pela técnica de semi-nested RT-PCR (região A – 327 pb), em fezes de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda entre maio/2008 e abril/2011 em Belém-Pará. Os criptogramas representando as amostras deste estudo estão organizados da seguinte maneira: local de estudo (Pará) / código da amostra / país de coleta (Brasil) / mês-ano de coleta.

Das 6 amostras classificadas pela região da RdRp como sendo GII.b tanto pela técnica de RT-PCR (2 amostras) quanto pela técnica de semi-nested RT-PCR (4 amostras), cinco puderam ser caracterizadas utilizando iniciadores específicos para a região do capsídeo (região D), considerada a mais variável do genoma viral, sendo todas classificadas como GII-3 (figura 13).

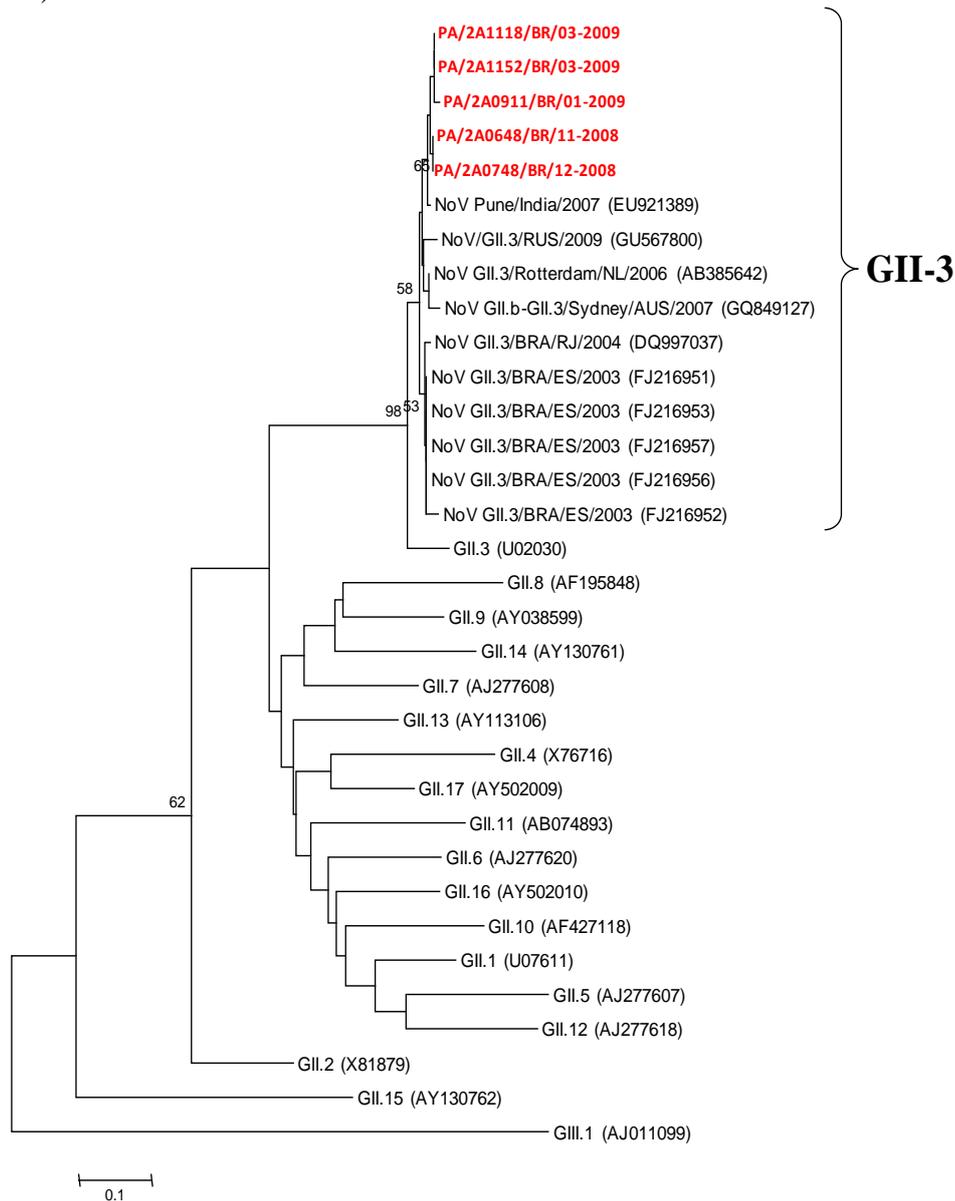


Figura 13. Dendrograma demonstrando a classificação genética, pela região do capsídeo (região D – 253 pb), das amostras caracterizadas como GII.b pela região da RdRp (regiões A ou B). Os criptogramas representando as amostras deste estudo estão organizados da seguinte maneira: local de estudo (Pará) / código da amostra / país de coleta (Brasil) / mês-ano de coleta.

As amostras sequenciadas foram analisadas quanto à origem das crianças infectadas, a fim de determinar se os genótipos observados possuíam a mesma procedência. Observou-se que aparentemente as amostras de mesmo genótipo não apresentavam o mesmo local de origem, sendo provenientes, sobretudo de bairros da região metropolitana de Belém, incluindo os distritos de Icoaraci, Outeiro e Mosqueiro. Somente três amostras sequenciadas foram de crianças residentes no interior do Estado, advindas de Abaetetuba, Tailândia e Currálinho (Arquipélago do Marajó).

6.4 DADOS CLÍNICOS

A distribuição por faixa etária demonstrou que as crianças menores de 2 anos de idade apresentaram a maior taxa de infecção por NoVs (90,1%-154/171) (OD = 3.3921, IC 95% 1.9385-5.9354, $p < 0.0001$, NNH = 5) (tabela 3).

Tabela 3 – Frequência por faixa etária dos casos positivos para norovírus detectados por EIA e/ou RT-PCR em crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda entre maio/2008 e abril/2011 em Belém-Pará.

FAIXA ETÁRIA (Meses)	POSITIVO/TOTAL TESTADO (%)
0 6	18/48 (37,5%)
6 12	61/140 (43,6%)
12 24	75/193 (38,8%)
24 36	10/63 (15,9%)
≥ 36	5/31 (16,1%)
Não Informado*	2/8 (25%)
TOTAL	171/483 (35,4%)

*Pacientes sem informações em suas fichas clínicas a respeito da data de seu nascimento.

O valor de OD revela que as crianças com gastroenterite nesta faixa etária apresentaram cerca de 3 vezes mais chances de serem acometidas pelos NoVs do que as de outras idades. Já o valor do NNH (número necessário para causar um evento desfavorável) indica que a cada 3 anos (período do estudo), um em cada cinco menores com quadro de gastroenterite apresentarão a infecção. A análise das fichas clínicas, contendo informações sobre os sinais e sintomas dos pacientes pediátricos, demonstrou que embora nem todas estivessem completamente preenchidas, foi possível a obtenção de alguns dados (tabela 4)

Tabela 4 – Principais sinais e sintomas apresentados por crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda entre maio/2008 e abril/2011 em Belém-Pará.

SINAIS/SINTOMAS	PREVALÊNCIA		P-VALOR
	Casos POS	Casos NEG	
VÔMITO	95,8% (137/143)	88,8% (206/232)	0.02
FEBRE	90,6% (116/128)	93,2% (247/265)	0.3
DESIDRATAÇÃO	94,4% (118/125)	87,4% (174/199)	0.04
NÁUSEA	98% (50/51)	100% (90/90)	0.6
ABDOME DISTENDIDO	88,9% (8/9)	92,8% (13/14)	0.7
DEBILITAÇÃO FÍSICA	86,4% (19/22)	96,1% (49/51)	0.1
MUCO NAS FEZES	71,4% (5/7)	88,2% (15/17)	0.1

De todos os parâmetros analisados, aqueles que apresentaram valores estatisticamente significantes foram o vômito (OD=2.8) e a desidratação (OD=2.4), demonstrando que crianças acometidas por esse patógeno apresentam duas vezes mais chances de manifestarem esses sintomas.

A maioria das crianças infectadas por NoVs apresentou mais de 9 dias de diarreia (41,2%) ($X^2=0.062$, $p=0.8$), 4 evacuações diárias (43,9%) ($X^2=2.435$, $p=0.1$) e mais de 5 episódios de vômito (90%) no período de internação (Teste-G=10.737, $p=0.001$). Estes mesmos parâmetros foram analisados comparando-os com os diferentes genótipos de NoVs observados neste estudo, a fim de identificar alguma associação entre eles (tabela 5).

Tabela 5 – Médias dos sinais e sintomas, analisadas em comparação com os diferentes genótipos de norovírus, observados infectando crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda entre maio/2008 e abril/2011 em Belém-Pará.

Sinais/Sintomas	GII.4d		GII.b/GII.3		GII.7	
	GII.4d (n= 42)	Demais genótipos (n= 10)	GII.b/GII.3 (n= 6)	Demais genótipos (n= 46)	GII.7 (n= 4)	Demais genótipos (n= 48)
Duração diarreia (em dias)	3,6 [30*] ($p=0.7$)**	3,2 [7]	3,3 [3]	3,6 [34]	3,2 [4]	3,6 [33]
Nº evacuações/dia	3,7 [33]	3,8 [7]	3,5 [4]	3,8 [36]	4,3 [3] ($p=0.9$)	3,7 [37]
Nº episódios vômito (período internação)	4,1 [6]	4,4 [5]	3,7 [4]	4,5 [7]	7 [1] ($p=0.1$)	4 [10]

* Quantidade de fichas que continham informações que puderam ser utilizadas nas análises.

** P-Valores obtidos a partir do teste U (Mann-Whitney).

6.5 SAZONALIDADE

Durante os três anos de estudo foram observados três picos de positividade, em setembro e outubro de 2008 (63,6%); e em fevereiro de 2010 (62,1%) (figura 14).

Foi mensurada a relação existente entre as taxas de positividade para NoVs e os parâmetros climáticos (pluviosidade, umidade relativa do ar e temperatura) nos três anos de estudo (figura 15), não tendo sido observada nenhuma correlação estatisticamente significativa (pluviosidade: $p=0.4780$; umidade: $p=0.6251$; temperatura: $p=0.1332$).

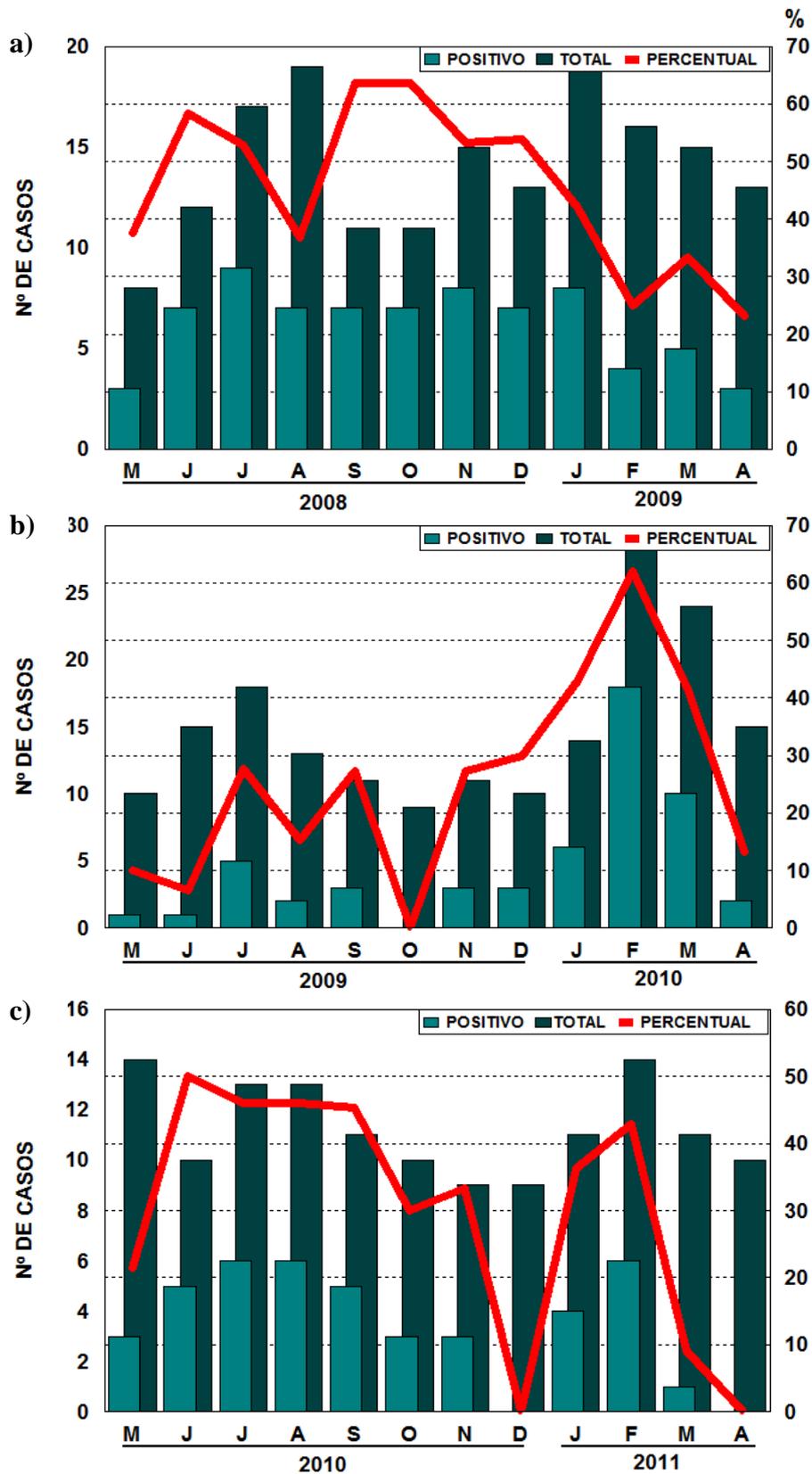


Figura 14. Distribuição mensal dos casos positivos para norovírus detectados em crianças hospitalizadas com gastroenterite, durante três anos de vigilância (maio/2008 a abril/2011) em um hospital pediátrico de Belém-Pará. a) primeiro ano de estudo (maio/2008 a abril/2009); b) segundo ano de estudo (maio/2009 a abril/2010); c) terceiro ano de estudo (maio/2010 a abril/2011).

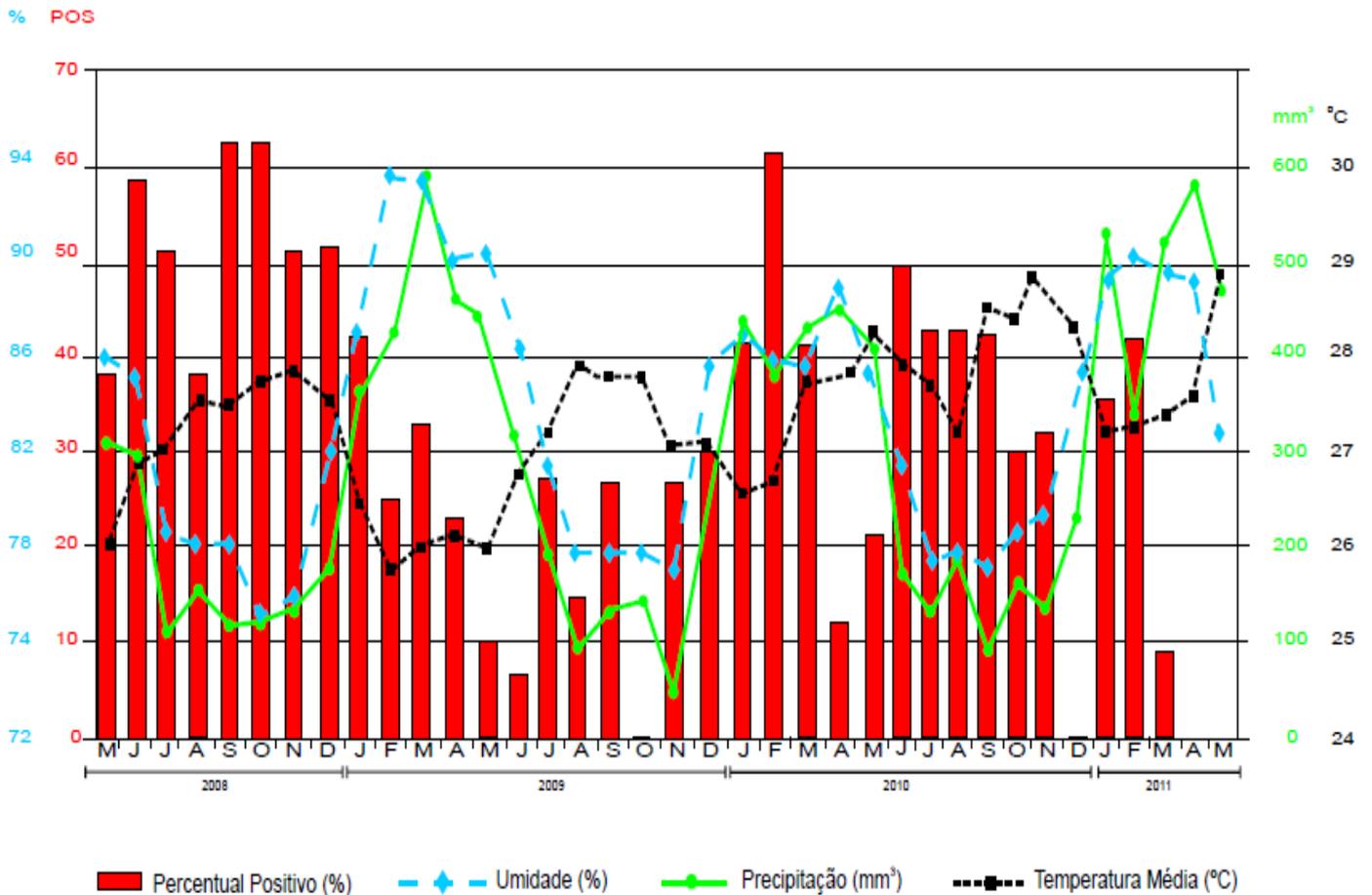


Figura 15. Correlação mensal entre as taxas de positividade para norovírus e os parâmetros climáticos (pluviosidade, umidade e temperatura) durante os três anos de estudo (maio/2008 a abril/2011) em Belém-Pará.

O gráfico de controle de séries temporais foi aplicado para monitorar o controle estatístico da sazonalidade. Foi observado que os dados apresentam distribuição normal ($p=0.734$), sendo então possível a aplicação do gráfico de controle 16, que revelou que a sazonalidade observada durante os 3 anos de estudo se encontrava sob controle estatístico.

Durante os três anos de coleta, as amostras também foram testadas para RoVs, sendo que somente aquelas com resultado negativo foram analisadas para NoVs. Foi então comparada a positividade em relação à sazonalidade obtida por ambos os patógenos neste triênio, sendo demonstrada que a frequência mensal de ambos sugere um efeito “gangorra”, em que quando um vírus apresenta alta taxa de infecção, o outro está em baixa frequência na população pediátrica e vice-versa (figura 17).

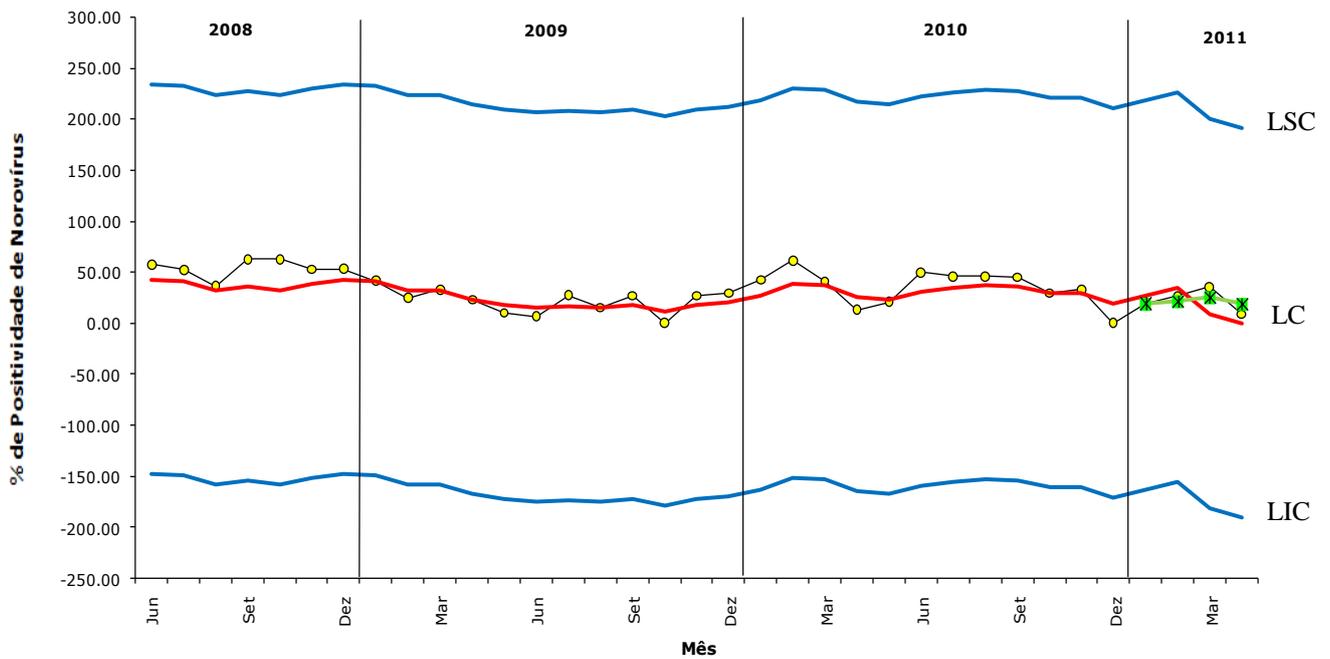


Figura 16. Gráfico de controle de séries temporais para o percentual de positividade dos norovírus no período de maio/2008 a abril/2011, em Belém-Pará. LSC: Limite superior de controle; LC: Linha central (cor vermelha); LIC: Limite inferior de controle; Estrelas em cor verde: previsão para os quatro últimos meses. Modelo gráfico proposto por Shewhart em 1924 (SHEWHART, 1931).

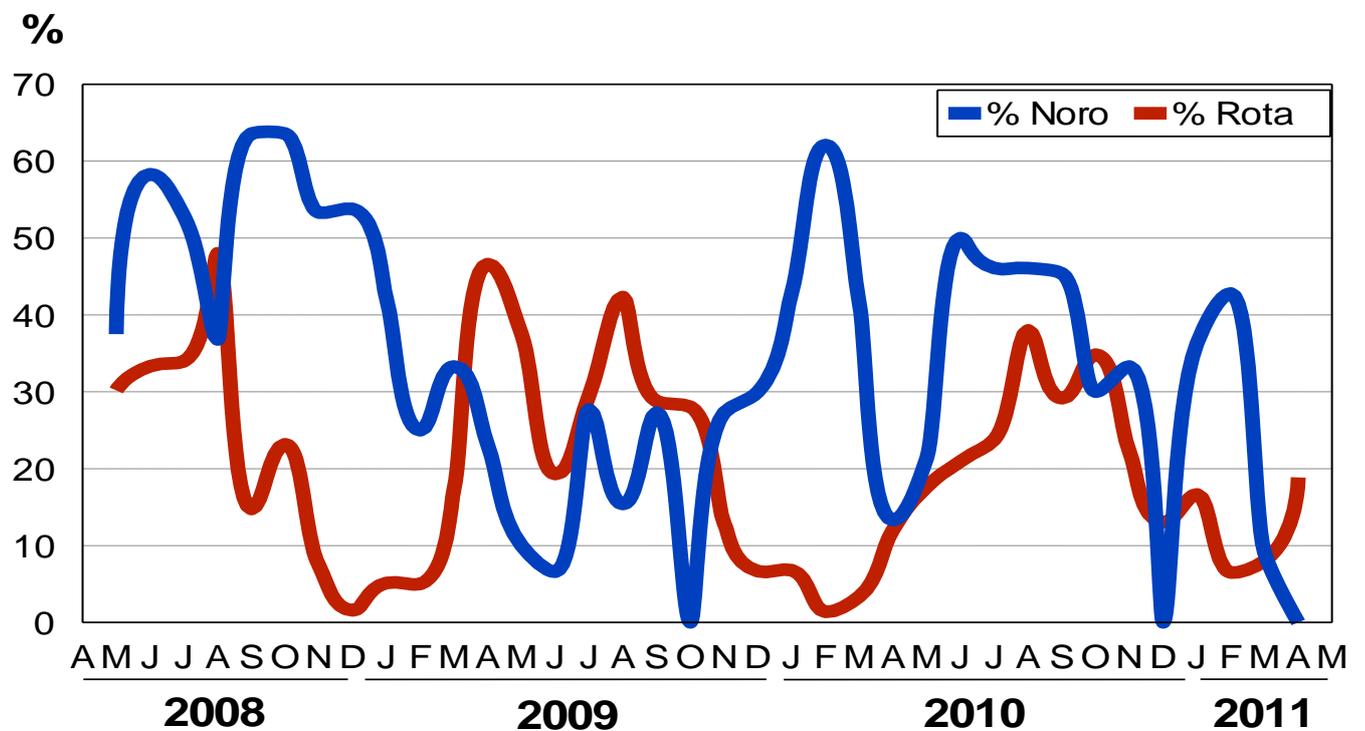


Figura 17. Sazonalidade observada para norovírus e rotavírus nos três anos de estudo (maio/2008 a abril/2011) em Belém-Pará.

7 DISCUSSÃO

A positividade obtida neste estudo (35,4%) foi similar a observada no Espírito Santo (39,7%) entre 2004 e 2006 e menor do que o verificado na Alemanha (49%) entre 2002 e 2008 (RIBEIRO et al., 2008; SPACKOVA et al., 2010). Contudo, quando comparada com a prevalência observada na cidade de Belém em estudos conduzidos anteriormente, tanto em pacientes hospitalizados quanto atendidos ambulatorialmente, fica claro a maior frequência desses agentes na população (14,6% [1992-1994]; 8,9% [1998-2000]; e 12,5% [2003]) (NAKAMURA et al., 2006; ARAGÃO et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2010b).

O aumento na prevalência dos NoVs foi também observado no Rio de Janeiro (49,8%) e em outros estados do Brasil (41,6%) (FERREIRA et al., 2010; MORILLO et al., 2011). Este fato pode estar relacionado a ampliação da circulação dos NoVs na população e/ou na melhoria da qualidade de métodos de detecção e vigilância deste patógeno. Contudo, é interessante notar que esse aumento ocorreu após a introdução da vacina monovalente Rotarix™ (VORH-GlaxoSmithKline Biological [GSK®]) no calendário nacional de imunização em março de 2006. Não se pode afirmar que a maior frequência esteja relacionada à imunização contra RoVs, contudo efeito semelhante foi observado na Nicarágua após a introdução da vacina pentavalente RotaTeq™ (RV5-Merck®) contra RoVs em outubro de 2006 (BUCARDO et al., 2011). Um estudo que visou avaliar se a vacina contra RoVs conferia imunidade contra a infecção por NoVs, demonstrou que em um grupo de 405 crianças, a maioria dos casos de norovirose ocorreram naquelas imunizadas contra RoVs (ZENG et al., 2010), semelhante ao observado no presente estudo, em que a maioria das crianças foi vacinada.

O EIA demonstrou ótimo desempenho para a detecção de NoVs. A sensibilidade observada neste estudo (85,9%) foi maior do que a observada em estudos conduzidos no Canadá (80,3%) e na Austrália (71%), contudo menor do que o demonstrado em pesquisa

conduzida previamente em Belém (92%), com amostras provenientes de quatro clínicas, incluindo a do presente estudo, na qual as amostras foram coletadas por um período menor de tempo, apenas dois meses (dezembro/2008 e janeiro/2009) (DIMITRIADIS E MARSHALL, 2005; CASTRICIANO et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2011). Com relação à especificidade (93,4%), a mesma foi maior do que as observadas na Espanha (73,1%), Irlanda (88%) e previamente em Belém (88%) (De BRUIN et al., 2006; WILHELMI de CAL et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2011).

As sensibilidades obtidas pelo EIA (87,7%) e pela RT-PCR (87,1%) quando se utilizou como “padrão ouro” os resultados obtidos por uma e/ou outra metodologia (curva ROC), indicam que ambas as técnicas apresentaram desempenho similar. O EIA demonstrou excelente reprodutibilidade de resultados quando comparados com os obtidos pelo método de referência (RT-PCR), o que sugere que as adaptações realizadas pelo fabricante na terceira geração do RIDASCREEN® Norovirus kit permitem sua utilização na detecção tanto de surtos quanto de casos esporádicos de gastroenterite, sem que haja grande variação nas taxas de positividade.

A utilização de técnicas mais sensíveis de detecção, como a semi-nested RT-PCR e a PCR em tempo real, confirmou 90,9% (20/22) da positividade obtida pelo EIA, cujo resultado havia sido negativo pela RT-PCR convencional, elevando os valores de sensibilidade (87,6%) e especificidade (99,3%). O emprego da RT-PCR convencional e do EIA na triagem de grande número de amostras, demonstra a relevância de se utilizar duas metodologias de detecção com o objetivo de evitar possíveis perdas de positividade desses agentes. Dessa maneira, o emprego de técnicas mais sensíveis como a semi-nested RT-PCR e a PCR em tempo real podem ser aplicadas como complementares as técnicas de triagem, quando há impossibilidade logística em se testar um grande número de amostras por essas metodologias.

O sequenciamento nucleotídico parcial de duas regiões distintas da RNA polimerase (ORF 1) (iniciadores utilizados na PCR convencional e na semi-nested RT-PCR) demonstrou que mais de 80,8% (42/52) das amostras foram GII.4d. Existem relatos deste genótipo circulando na população de Belém desde 1998 (SIQUEIRA et al., 2010b). Uma revisão sistemática da literatura realizada por Patel et al. (2008) reuniu dados de estudos conduzidos em diferentes locais, incluindo a América Latina, no período de 18 anos (1990-2008) e concluiu que este genótipo foi o responsável por 75-100% dos casos de gastroenterite tanto em surtos como em casos esporádicos. Uma ampla diversidade de GII.4 variantes foi reportada por esses autores, destacando o grande potencial de variabilidade genética atribuído a esse genótipo em todo o globo (JOHANSEN et al., 2008; OKADA et al., 2007).

Um percentual de 9,3% das amostras sequenciadas foram classificadas como GII.7. Esse genótipo já foi registrado em um paciente pediátrico atendido ambulatorialmente na província de Chongqing, China (ZENG et al., 2012). Entre 2006 e 2010, foi considerado o terceiro principal genótipo relacionado a surtos de gastroenterite na Bélgica, sendo responsável por 2 surtos neste período (MATHIJS et al., 2011). A presença deste genótipo também já foi relatada em dois pacientes imunocomprometidos internados em um hospital universitário da Alemanha, vitimados por um surto de gastroenterite causado pelo genótipo GII.4 em 2006. Vale mencionar, que esses pacientes foram os únicos que apresentaram a cepa GII.7 dentre aqueles que foram hospitalizados em virtude deste surto. Verificou-se um longo período de excreção viral (27 e 81 dias) e essas amostras apresentaram-se intimamente relacionadas com isolados da Ásia datados de 1990 e 1994, sendo sugerida recombinação, com evidencia de evolução intra-individual em pacientes infectados cronicamente (HOFFMANN et al., 2010).

Foi observada a presença da cepa GII.b em 11,5% (6/52) das amostras classificadas pela região da RdRp, as quais também foram submetidas ao sequenciamento genômico da região do capsídeo (ORF 2) a fim de determinar o genótipo circulante, considerando que,

segundo Bull et al. (2007), a classificação das polimerases em GII.a, GII.b, GII.c, GII.d ou GII.e as caracteriza como cepas indefinidas. Foi verificado que 83,3% (5/6) das amostras caracterizadas como GII.b foram classificadas como GII.3 quando analisadas pela região do capsídeo.

A presença de cepas GII.b (região da RdRp)/GII.3 (região do capsídeo) sugerem fortemente a presença de genótipos recombinantes, especialmente considerando que este é o tipo de recombinação intergenotípica mais observada no mundo. Esta cepa tem sido alvo de estudos por já ter sido descrito como o principal responsável por surtos de gastroenterite na Europa, Austrália e Ásia (AMBERT-BALAY et al., 2005; BULL et al., 2005; PHAN et al., 2006, 2007). No Brasil, o genótipo GII.3 já foi reportado infectando principalmente crianças assintomáticas em Vitória-ES, entre os anos de 2003 e 2004 (BARREIRA et al., 2010). Também já foram detectados em São Paulo (1995-1999) e no Rio de Janeiro (2004), inclusive com evidências de cepas recombinantes (CASTILHO et al., 2006; VICTORIA et al., 2007). Em Belém, é a primeira vez que se conjectura a possibilidade de genótipos recombinantes circulando na população.

Contudo, para confirmar a presença de recombinação é necessário o sequenciamento completo da região do capsídeo, a fim de determinar a presença de 16 aminoácidos que constituem um perfil único deste recombinante, sendo capaz de diferenciá-lo dos genótipos GII.3 que circulam comumente. Uma alternativa para a confirmação de cepas recombinantes é o sequenciamento da região de junção entre as ORFs 1 e 2 e a construção do gráfico de SimPlot (LOLE et al., 1999), que descartariam a possibilidade de não se tratar de recombinação e sim de co-infecção entre diferentes genótipos nas amostras que foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico de ambas as regiões (BUESA et al., 2002; CHHABRA et al., 2010).

As amostras sugestivas de serem recombinantes foram coletadas entre novembro/2008 e março/2009, compreendendo o primeiro ano de estudo (maio/2008 a abril/2009). Curiosamente, este foi o período de maior ocorrência dos casos de gastroenterite ocasionadas por NoVs. Uma explicação plausível, é que caso estas amostras se tratem realmente de genótipos recombinantes, esse ano pode ter sido o período de surgimento desta linhagem em Belém, antígenicamente nova em uma população susceptível, o que naturalmente favoreceria o aumento das infecções pela falta de um quadro imunológico estabelecido contra essa nova cepa em circulação. Contudo, mais estudos necessitam ser realizados a fim de comprovar essa hipótese, principalmente envolvendo o sequenciamento nucleotídico das outras 119 amostras positivas no estudo, a fim de determinar se existem outras suspeitas de recombinação e se todas se concentraram nesse mesmo período, bem como se houve a circulação de novos genótipos a partir deste momento.

As crianças abaixo de dois anos de idade foram as mais acometidas pela infecção viral. Resultados similares de prevalência nesta faixa etária foram observados em estudos conduzidos em Vitória e previamente em Belém (ARAGÃO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2008). No entanto, esta diferença não foi verificada por Borges e colaboradores (2006) em crianças sintomáticas abaixo de três anos residentes na região central do país. No mundo, a prevalência deste patógeno é maior em crianças abaixo dos 5 anos e pessoas acima dos 65 anos como observado em estudos conduzidos na Inglaterra, Austrália, Hong Kong e Irlanda (De WIT et al., 2001; MARSHALL et al., 2003; LAU et al., 2004; AMAR et al., 2007; PHILLIPS et al., 2010).

Observou-se grande variedade de manifestações clínicas apresentadas pelos menores hospitalizados, no entanto somente vômito e desidratação indicaram alguma correlação com a infecção por NoVs, considerando que a diarreia foi critério de inclusão no estudo. O fato de muitas fichas clínicas não estarem completamente preenchidas, reforça a idéia de que muitos

destes dados clínicos estejam subestimados, especialmente aqueles já retratados na literatura como sendo comumente relacionados aos NoVs, como dores abdominais e náuseas (CDC, 2011).

Foi verificado um período relativamente longo de manifestações clínicas com as crianças apresentando mais de 9 dias de diarreia e mais de 5 episódios de vômito no período de internação, diferentemente do que é comumente reportado na literatura (até 3 dias de manifestações) (CDC, 2011). Contudo, como citado por Lopman et al. (2004) esse período pode ser prolongado quando se tratam de crianças, idosos e pacientes hospitalizados, como é o caso deste estudo.

Vale ressaltar que essas manifestações clínicas prolongadas, bem como o longo período de internação de muitos pacientes, podem ter sido potencializados pela infecção por outros patógenos, especialmente aqueles que causam infecções respiratórias, visto que 17% dos menores hospitalizados acometidos por NoVs, também apresentaram em seus prontuários, diagnóstico clínico comprovado de doença respiratória, tendo sido relatados quadros de bronquite, bronquiolite, pneumonia, bronco-pneumonia, gripe, resfriado e tosse.

Apesar de não ter sido observada associação estatisticamente significativa entre as infecções respiratórias e a duração do tempo de diarreia ($p=0.8324$), número de evacuações ($p=0.2677$) e episódios de vômito ($p=0.3894$), acredita-se que outros fatores como uso prolongado de medicamentos (que podem gerar efeitos colaterais), possível imunossupressão dos menores e outras infecções, sobretudo, parasitárias, podem estar envolvidos no prolongamento dessas manifestações clínicas ou do período de internação das crianças, porém sem possibilidade de serem comprovados, em virtude da ausência de algumas informações nas fichas clínicas destes pacientes.

A duração do tempo de diarreia, número de evacuações diárias e de episódios de vômito no período de internação, foram analisados separadamente em comparação com os

diferentes genótipos de NoVs encontrados no estudo. Observou-se que, aparentemente, as crianças infectadas com NoVs GII.4d apresentaram maior média de duração da diarreia (3,6 dias) em relação aos outros genótipos encontrados (GII.b/GII.3 [3,3 dias] e GII.7 [3,2 dias]). Em contrapartida, os menores infectados com NoVs GII.7 apresentaram maior média de evacuações por dia (4,3 evacuações) contra 3,7 (GII.4d) e 3,5 (GII.b/GII.3), bem como maior quantidade de episódios de vômito no período de internação (7 episódios) contra 4,1 (GII.4d) e 3,7 (GII.b/GII.3). Autores sugerem que possa existir relação entre o genótipo de NoVs com os sinais/sintomas apresentados durante a infecção (FRIESEMA et al., 2009), podendo-se observar diferenças de sintomatologia dependendo do genótipo. Contudo, dados mais consistentes são necessários para confirmar se de fato, a infecção causada pelos genótipos encontrados nesse estudo, influenciou na maior duração do tempo de diarreia, do número de evacuações diárias e episódios de vômito, especialmente considerando que o p-valor demonstrado não foi estatisticamente significativo. Uma alternativa para melhor trabalhar esta hipótese, seria a caracterização molecular de mais amostras positivas desse estudo, a fim de aumentar a quantidade de genótipos identificados e permitir uma análise mais segura.

Durante os três anos de vigilância foi demonstrada maior prevalência em setembro e outubro de 2008 (63,6%) e em fevereiro de 2010 (62,1%), sendo que nenhuma correlação estatisticamente significativa foi observada quando comparada aos parâmetros climáticos analisados. Muitos estudos de sazonalidade descrevem um aumento das taxas de infecção por NoVs nos meses de inverno nos países de clima temperado (FRETZ, 2005). Ao contrário, nos países tropicais, a infecção por esses patógenos são observadas ao longo de todo o ano, não demonstrando um padrão sazonal de ocorrência como observado em um estudo conduzido durante 8 anos (1998-2007) na região sudeste do Brasil (SOARES et al., 2007).

Na região central do país (clima subtropical), os NoVs também circularam ao longo de todo o ano, contudo apresentando picos de prevalência de setembro a março, período chuvoso

e com alta umidade (BORGES et al., 2006). No Rio de Janeiro foi observado um perfil bifásico de prevalência que compreendeu o período de março a maio e setembro a outubro de 2004 (VICTORIA et al., 2007), sendo este último semelhante ao observado no presente estudo. De fato, assim como nessas outras regiões, Belém parece não apresentar um padrão sazonal de infecção para os NoVs.

Esses dados denotam que mais estudos são necessários para melhor elucidar quais fatores influenciam nas taxas de infecção viral, se realmente envolvem fatores climáticos ou comportamentais da população, especialmente considerando que o Brasil tem dimensões continentais e a região amazônica pode diferir significativamente em termos epidemiológicos de outras regiões do país e do mundo.

Foi empregado o gráfico de controle de séries temporais a fim de monitorar a sazonalidade observada para os NoVs nos três anos de vigilância. Verificou-se que o processo se encontrava sob controle estatístico, sendo observada uma tendência à estabilidade, sem evidência de sazonalidade (indicação de um padrão de flutuação na série no período de um ano) e nem de ciclo (indicações de padrões na série que se repetem nos períodos superiores a um ano). Não foi revelado nenhum valor discrepante ao longo dos três anos, que fugisse às linhas de controle estatístico, sugerindo fortemente que não houve nenhum fator atípico que pudesse influenciar a estabilidade da série, tão pouco a presença de viés na coleta mensal das amostras.

Com relação à sazonalidade observada para NoVs e RoVs, verificou-se um efeito “gangorra” nas taxas mensais de positividade de ambos os vírus. Principalmente nos dois primeiros anos de estudo (maio/2008 a abril/2010) ficou claro que quando a taxa de detecção para NoVs está alta, a de RoVs está baixa e vice-versa. Este achado justifica o porquê do número de casos de diarreia se manter constantemente elevado.

Não foi observada a presença do genogrupo GI circulando entre as crianças hospitalizadas neste estudo. A prevalência de GII sobre GI é amplamente demonstrada em estudos nos mais diversos lugares do mundo (BON et al., 1999; FOLEY et al., 2000; MARTÍNEZ et al., 2002; SUBEKTI et al., 2002). A razão de cepas pertencentes à GII serem mais observadas na população ainda é pouco conhecida, contudo propriedades biológicas, virulência, rotas de transmissão e estabilidade do vírus no ambiente podem ser possíveis explicações (BUESA et al., 2002). Apesar de não ter sido detectado, é reconhecida a presença de GI nos ecossistemas aquáticos de Belém (TEIXEIRA et al., 2011), evidenciando assim, a circulação deste genogrupo na população. Desta maneira, acredita-se que a virulência possa ser um dos principais fatores para não encontrá-lo em menores hospitalizados, já que uma baixa virulência manifestaria quadros clínicos mais brandos, o que provavelmente não iria requerer internação.

8 CONCLUSÕES

- O percentual de positividade obtido (35,4%) nesse estudo evidenciou a importância dos NoVs como patógenos associados a quadros de gastroenterite grave que requerem hospitalização;
- A alta prevalência observada reforça que na era pós-vacina contra RoVs, se faz necessária uma vigilância ativa de outros enteropatógenos, uma vez que se observou um considerável aumento nas taxas de prevalência dos NoVs após a introdução, em março de 2006, da vacina RotarixTM no calendário nacional de imunização;
- A excelente reprodutibilidade de resultados apresentados pelo EIA, indica seu uso na detecção dos NoVs tanto em surtos, quanto na triagem de casos esporádicos de gastroenterite;
- A prevalência da cepa GII.4d (mais frequente em todo o mundo) e de possíveis recombinantes, demonstram que os genótipos circulantes em Belém apresentam grande potencial de variabilidade genética, o que pode favorecer sua persistência na população por longos períodos conforme amplamente descrito na literatura, sendo necessária maior atenção dos pesquisadores;
- A maior frequência dos NoVs infectando crianças menores de 2 anos e a presença, principalmente de vômito e desidratação, confirmam aquilo que é largamente difundido na literatura, requerendo maior cuidado dos profissionais de saúde no atendimento médico e de enfermagem;
- Não foi definida nenhuma sazonalidade, bem como não se observou nenhuma correlação entre as taxas de positividade e os parâmetros climáticos analisados. Verificou-se uma

alternância na prevalência mensal entre os NoVs e os RoVs, o que supõe que as medidas de prevenção e controle destes patógenos devem ser objetos de atenção das autoridades e da população ao longo de todo o ano;

- Por fim, os dados obtidos neste estudo podem servir de base para pesquisas com vacinas candidatas para NoVs; e reforçam a necessidade de uma vigilância ativa para o controle dos genótipos circulantes, e as intervenções necessárias, a fim de diminuir a morbidade ocasionada por esse vírus.

9 PERSPECTIVAS

Pretende-se confirmar pela análise molecular da região de junção das ORFs 1 e 2 ou pelo sequenciamento completo da região do capsídeo viral, se as 5 amostras classificadas como GII.b(polimerase)/GII.3(capsídeo) realmente são recombinantes. Além destas amostras, seria incluída nesta análise mais uma classificada como GII.b pela RdRp, mas que não se obteve resultados satisfatórios quando analisadas pelo capsídeo, para verificar se também se trata de uma amostra GII.3.

Também se objetiva testar algumas amostras classificadas, pela RdRp, como GII.4d e GII.7, com os iniciadores de cadeia específicos para o capsídeo, a fim de verificar se houve alguma alteração na classificação destas amostras que poderiam sugerir alguma recombinação.

Por fim, poderá ser realizado o teste de ME nas duas amostras que foram positivas pelo EIA e negativas por todas as outras técnicas utilizadas (RT-PCR convencional, semi-nested RT-PCR e PCR em tempo real) para uma confirmação final de seu resultado.

REFERÊNCIAS

- AGUS, S.G., DOLIN, R., WYATT, R.G., TOUSIMIS, A.J., NORTHRUP, R.S. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. **Ann Intern Medicine**, n. 79, p. 18–25, 1973.
- ALBERT, M.J. Epidemiology and molecular biology of *Vibrio cholerae* O139 Bengal. **Indian J Med Res**, n. 104, p. 14-27, 1996.
- ALMEIDA, M.T.G., SILVA, R.M., DONAIRE, L.M., MOREIRA, L.E., MARTINEZ, M.B. Entoropatógenos associados com diarreia aguda em crianças. **J Pediatr**, n. 4, p. 291-298, 1998.
- AMAR, C.F., EAST, C.L., GRAY, J., ITURRIZA-GOMARA, M., MACLURE, E.A., MCLAUHLIN, 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**, n. 26, p. 311–323, 2007.
- AMBERT-BALAY, K., BON, F., LE GUYADER, F., POTHIER, P., KOHLI, E. Characterization of new recombinant noroviruses. **J Clin Microbiol**, n. 43, p. 5179–5186, 2005.
- ANDERSON, A.D., GARRETT, V.D., SOBEL, J., MONROE, A.S., FANKHAUSER, R.L., SCHWAB, K.J., BRESEE, J.S., MEAD, P.S., HIGGINS, C., CAMPANA, J., GLASS, R.I. Multistate outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis associated with a common caterer. **Am J Epidemiol**, n. 11. p. 1013-1019. 2001.
- ARAGÃO, G.C., OLIVEIRA, D.S., SANTOS, M.C., MARENHAS, J.D.P., OLIVEIRA, C.S., LINHARES, A.C., GABBAY, Y.B. Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. **Rev Pan-Amaz Saude**, n.1. p.149-157. 2010.
- ARIAS, C., SALA, M.R., DOMÍNGUEZ, A., TORNER, N., RUÍZ, L., MARTÍNEZ, A., BARTOLOMÉ, R., SIMÓN, M., BUESA, J. Epidemiological and clinical features of norovirus gastroenteritis in outbreaks: a population-based study. **Clin Microbiol Infect**, n. 1, p. 39-44, 2010.
- ARMBRUST, S., KRAMER, A., OLBERTZ, D., ZIMMERMANN, K., FUSCH, C. Norovirus infections in preterm infants: wide variety of clinical courses. **BMC Research**, n. 96, p. 1- 6, 2009.
- ATMAR, R.L., ESTES, M.K. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. **Clin Microbiol Rev**, n. 14, p.15-37, 2001.
- ATMAR, R.L., NEILL, F.H., LE GUYADER, F.S. Detection of human caliciviruses in fecal samples by RT-PCR. **Methods Mol Biol**, n. 665, p. 39-50, 2011.

AYRES, M., JR, M.A., AYRES, D.L., dos SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. 5ed. Belém, Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM/MCT/CNPq. 2007. 364pp.

BAE, J., SCHWAB, K.J. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and ground water. **Appl Environ Microbiol**, n. 74, p. 477-484, 2008.

BARREIRA, D.M., FERREIRA, M.S., FUMIAN, T.M., CHECON, R., DE SADOVSKY, A.D., LEITE, J.P., MIAGOSTOVICH, M.P., SPANO, L.C. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in southeastern Brazil. **J Clin Virol**, n. 47, p. 60-64, 2010.

BEERSMA, M.F.C., SCHUTTEN, M., VENNEMA, H., HARTWIG, N.G., MES, T.H.M., OSTERHAUS, A.D.M.E., VAN DOORNUM, G.J.J., KOOPMANS, M. Norovirus in a Dutch tertiary care hospital (2002e2007): frequent nosocomial transmission and dominance of GIIB strains in young children. **J Hosp Infect**, n. 71, p. 199-205, 2009.

BLACK, R.E., COUSENS, S., JOHNSON, H.L., LAWN, J.E., RUDAN, I., BASSANI, D.G., JHA, P., CAMPBELL, H., WALKER, C.F., CIBULSKIS, R., EISELE, T., LIU, L., MATHERS, C. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, n. 375, p. 1969-1987, 2010.

BLAZEVICIA, V., LAPPALAINENA, S., NURMINENA, K., HUHTIA, L., VESIKARIA, T. Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood Gastroenteritis. **Vaccine**, n. 29, p. 8126–8133, 2011.

BON, F., FASCIA, P., DAUVERGNE, M., TENENBAUM, D., PLANSON, H., PETION, A.M., POTHIER, P, KOHLI. E. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. **J Clin Microbiol**, n. 9, p. 3055-3058, 1999.

BOOM, R., SOL, C.J., SALIMANS, M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M., VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, n. 28. p. 495-503. 1990.

BORGES, A.M.T., TEIXEIRA, J.M.S., COSTA, P.S.S., GIUGLIANO, L.G., FIACCADORI, FRANCO, R.C., BRITO, W.M.E.D., LEITE, J.P.G., CARDOSO, D.D.P. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central Region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n.101. p. 721-724. 2006.

BOXMAN, I.L.A., TILBURG, J.J.H.C., te LOEKE, N.A.J.M., VENNEMA, H., JONKER, K., de BOER, E., KOOPMANS, M. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. **Inter J Food Microbiol**, n. 108. p. 391–396. 2006.

BRASIL. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo / Coordenadoria de Controle de Doenças / Centro de Vigilância Epidemiológica / Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Nota Técnica: Diarréia Aguda no Verão**. São Paulo, 2010. p.1-5.

BRASIL. Portaria nº 104, de 25 de janeiro de 2011. **Estabelece normas relativas à notificação compulsória de doenças**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_104_26_2011_dnc.pdf. Acesso em: 05 abr. 2011.

BRUIN, E., DUIZER, E., VENNEMA, H., KOOPMANS, M.P.G. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. **J Virol Methods**, n. 137, p. 259–264, 2006.

BRYCE, J., BOSCHI-PINTO, C., SHIBUYA, K., BLACK R.E. WHO estimates of the causes of death in children. **Lancet**, n.65. p. 1147–1152. 2005.

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**, n. 10, p. e25962, 2011.

BUESA, J., COLLADO, B., LÓPEZ-ANDÚJAR, P., ABU-MALLOUH, R., RODRÍGUEZ, D.J., GARCÍA, D.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**, n. 8, p. 2854–2859, 2002.

BULL, R.A., HANSMAN, G.S., CLANCY, L.E., TANAKA, M.M., RAWLINSON, W.D. & WHITE, P.A. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. **Emerg Infect Dis**, n. 11, p. 1079–1085, 2005.

BULL, R.A., TU, E.T.V., MCIVER, C.J., RAWLINSON, W.D., WHITE, P.A. Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis. **J Clin Microbiol**, n. 2, p. 327–333, 2006.

BULL, R.A., TANAKA, M.M., WHITE, P.A. Norovirus recombination. **J Gen Virol**, n. 88, p. 3347–3359, 2007.

CAMPOS, G.S., MOREAU, V.H., BANDEIRA, A., BARBERINO, G., ALMEIDA, P.F., AMADOR, D. M., LIMA, M.O., SARDI, S.I. Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. **Arch Virol**, n. 153, p. 1125–1129, 2008.

CANNELL, J.J., VIETH, R., UMHAU, J.C., HOLICK, M.F., GRANT W.B., MADRONICH, S., GARLANDE, C.F., GIOVANNUCD, E. Epidemic influenza and vitamin D. **Epidemiol Infect**, n. 134, p. 1129–1140, 2006.

CARDOSO, D., FIACCADORI, F.S., BORGES, L.D.S.M., BRINGEL, M.R.M., LEITE, J.P.G. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiania, Goias, Brazil. **Med Sci Monit**, n. 8. p. 624–628. 2002.

CARSTENS, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). **Arch Virol**, n.155, p. 133–146, 2010.

CASTILHO, J.G., MUNFORD, V., RESQUE, H.R., FAGUNDES-NETO, U., VINJÉ, J., RÁCZ, M.L. Genetic Diversity of Norovirus among Children with Gastroenteritis in São Paulo State, Brazil. **J Clin Microbiol**, n. 11, p. 3947–3953, 2006.

CASTRICIANO, S., LUINSTRAS, K., PETRICH, A., SMIEJA, M., LEE, C., JANG, D., PORTILLO, E., CHERNESKY, M. Comparison of the RIDASCREEN norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy. **J Virol Methods**, n. 141, p. 216-219, 2007.

CDC. Updated Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines. **MMWR**, n. 3. p. 1-20. 2011.

CHAN, N.Y., EBI, K.L., SMITH, F., WILSON, T.F., SMITH, A.E. An integrated assessment framework for climate change and infectious diseases. **Environ Health Perspect**, n. 107, p. 329–337, 1999.

CHEETHAM, S., SOUZA, M., MEULIA, T., GRIMES, S., HAN, M.G., SAIF, L.J. Pathogenesis of a Genogroup II Human Norovirus in Gnotobiotic Pigs. **J Virol**, n. 80, p. 10372–10381, 2006.

CHHABRA, P., CHITAMBAR, S.D. Norovirus genotype IIb associated acute gastroenteritis in India. **J Clin Virol**, n. 42, p. 429–432, 2008.

CHHABRA, P., WALIMBE, A.M., CHITAMBAR, S.D. Complete genome characterization of Genogroup II norovirus strains from India: Evidence of recombination in ORF2/3 overlap. **Infection, Genetics and Evolution**, n. 10, p. 1101–1109, 2010.

CLARK, B., MCKENDRICK, M. A review of viral gastroenteritis. **Cur Opin Infect Dis**, n. 17, p. 461-469, 2004.

CLARK, I.N., ESTES, M.K., GREEN, K.Y., HANSMAN, G.S., KNOWLES, N.J., KOOPMANS, M.K., MATSON, D.O., MEYERS, G., NEILL, J.D., RADFORD, A., SMITH, A.W., STUDDERT, M.J., THIEL, H.-J., VINJÉ, J. **Family Caliciviridae**. In: KING, A.M.Q., ADAMS, M.J., CARSTENS, E.B., LEFKOWITZ. *Virus taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier/Academic Press, 2012. p. 977-986.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica, Manual das doenças transmitidas por alimentos norovirus/norovirose. **Informe – NET DTA**, 2010.

DE BRUIN, E., DUIZER, E., VENNEMA, H., KOOPMANS, M.P.G. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. **J Virol Methods**, n. 137, p. 259–264, 2006.

DE WIT, M.A., KOOPMANS, M.P., KORTBEEK, L.M. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. **Am J Epidemiol**, n. 154, p. 666–674, 2001.

DIAS, D.M., SILVA, A.P., HELFER, A.M., MACIEL, A.M.T.R., LOUREIRO, E.C.B., SOUZA, C.O. Morbimortalidade por gastroenterites no Estado do Pará. **Rev Pan-Amaz Saude**, n. 1, p. 53-60, 2010.

DIMITRIADIS, A., MARSHALL, J.A. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for detection of norovirus in outbreak specimens. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, n. 24, p. 615–618, 2005.

DIMITRIADIS, A., BRUGGINK, L.D., MARSHALL, J.A. Evaluation of the Dako IDEIA norovirus EIA assay for detection of norovirus using faecal specimens from Australian gastroenteritis outbreaks. **Pathology**, n. 38, p. 157-165, 2006.

DISKIN, A. **Gastroenteritis in Emergency Medicine**. EUA Estados Unidos, 2009. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/775277-overview>>. Acesso em: 05/04/2011.

DOLIN, R., LEVY, A.G., WYATT, R.G., THORNHILL, T.S., GARDNER, J.D. Viral gastroenteritis induced by the Hawaii agent. Jejunal histopathology and serologic response. **Am J Med**, n. 59, p. 761–768, 1975.

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**, n. 225, p. 190-211, 2008.

DOULTREE, J.C., DRUCE, J.D., BIRCH, C.J., BOWDEN, D.S., MARSHALL, J.A. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. **J Hosp Infect**, n. 41, p. 51-57, 1999.

DOWELL, S.F. Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. **Emerg Infect Dis**, n. 7, p. 369–374, 2001.

DUIZER, E., BIJKERK, P., ROCKX, B., DE GROOT, A., TWISK, F., KOOPMANS, M. Inactivation of caliciviruses. **Ap Envir Microbiol**, n. 8. p. 4538-4543. 2004a.

DUIZER, E., SCHWAB, K.J., NEILL, F.H., ATMAR, R.L., KOOPMANS, M.P.G., ESTES, M.K. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. **J Gen Virol**, n. 85, p. 79–87, 2004b.

ESTES, M.K., HARDY, M.E. **Norwalk virus and other enteric caliciviruses**. In: BLASER, M; SMITH, P; RAVDIN, J; GREENBERG, H.B; GUERRANT, R. Infections of the gastrointestinal tract. New York: Lippincott-Raven, 1995. p. 1009–1034.

ESTES, M.K., BALL, J.M., GUERRERO, R.A., OPEKUN, A.R., GILGER, M.A., PACHECO, S.S., GRAHAM, D.Y. Norwalk Virus Vaccines: Challenges and Progress. **J Infect Dis**, n. 181 (Suppl 2), p. 367–373, 2000.

ETHERINGTON, G.J., DICKS, J., ROBERTS, I.N. High throughput sequence analysis reveals hitherto unreported recombination in the genus Norovirus. **Virology**, n. 345, p. 88–95, 2006.

FANKHAUSER, R.L., MONROE, S.S., NOEL, J.S., HUMPHREY, C.D., BRESEE, J.S., PARASHAR, U.D., ANDO, T., GLASS, R.I. Epidemiological and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. **J Infect Dis**, n. 186, p. 1-7, 2002.

FARKAS, T., SESTAK, K., WEI, C., JIANG, X. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. **J Virol**, n. 82, p. 5408-5416, 2008.

FERREIRA, M.S.R., XAVIER, M.P.T.P., FUMIAN, T.M., VICTORIA, M., OLIVEIRA, S.A., PENA, L.H.A., LEITE, J.P.G., MIAGOSTOVICH, M.P. Acute gastroenteritis cases associated with norovirus infection in the state of Rio de Janeiro. **J Med Virol**, n. 80, p. 338-344, 2008.

FERREIRA, M.S.R., VICTORIA, M., CARVALHO-COSTA, F.A., VIEIRA, C.B., XAVIER, M.P., FIORETTI, J.M., ANDRADE, J., VOLOTÃO, E.M., ROCHA, M., LEITE, J.P., MIAGOSTOVICH, M.P. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005-2008. **J Med Virol**, n. 82, p. 1442-1448, 2010.

FINE, P.E., CLARKSON, J.A. Measles in England and Wales - I: an analysis of factors underlying seasonal patterns. **Int J Epidemiol**, n. 11, p. 5-14, 1982.

FIORETTI, J.M., FERREIRA, M.S.R., VICTORIA, M., VIEIRA, C.B., XAVIER, M.P.T.P., LEITE, J.P.G., MIAGOSTOVICH, M.P. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n. 8, p. 942-947, 2011.

FOLEY, B., O'MAHONY, J., MORGAN, S.M., HILL, C., MORGAN, J.G. Detection of sporadic cases of Norwalk-like virus (NLV) and astrovirus infection in a single Irish hospital from 1996 to 1998. **J Clin Virol**. n. 2, p. 109-17, 2000.

FRETZ, R., HERRMANN, L., CHRISTEN, A., SVOBODA, P., DUBUIS, O., VIOLLIER, E.H., TANNER, M. Frequency of Norovirus in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms in Switzerland. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, n. 4, p. 214-216, 2005.

FRIESEMA, I.H.M., VENNEMA, H., HEIJNE, J.C.M., JAGER, C.M., TEUNIS, P.F.M., VAN DER LINDE, R., DUIZER, E., VAN DUYNHOVEN, Y.T.H.P. J. Differences in clinical presentation between norovirus genotypes in nursing homes. **Clin Virol**, n. 46, p. 341-344, 2009.

GABBAY, Y. B., GLASS, R.L., MONROE, S.S., CARCAMO, C., ESTES, M.K., MASCARENHAS, J. D.P., LINHARES, A.C. Prevalence of antibodies to norwalk virus among amerindians in isolated amazonian communities. **Am J Epid**, n. 7. p. 728-733. 1994.

GALLIMORE, C.I., BARREIROS, M.A.B., BROWN, D.W.G., NASCIMENTO, J.P., LEITE, J.P.G. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Med Biol Res**, n. 37, p. 321-326, 2004.

GLASS, R.I., NOEL, J., ANDO, T., FANKHAUSER, R., BELLLOT, G., MOUNTS, A., PARASHAR, U.D., BRESEE, J.S., MONROE, S.S. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. **J Infect Dis**, n.181. p. 254-261. 2000.

GLASS, R.I., BRESEE, J., JIANG, B., GENTSCH, J., ANDO, T., FANKHAUSER, R., NOEL, J., PARASHAR, U., ROSEN, B., MONROE, S.S. Gastroenteritis viruses: an overview. **Novartis Found Symp**, n. 238. p. 05-19. 2001.

GONZÁLEZ, G.G., LIPRANDI, F., LUDERT, J.E. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for the detection of norovirus antigen in fecal samples from children with sporadic acute gastroenteritis. **J Virol Methods**, n. 136. p. 289–291. 2006.

GONZALEZ-GALAN, V., SÁNCHEZ-FAUQUIER, A., OBANDO, I., MONTERO, V., FERNANDEZ, M., J. TORRES, M., NETH, O., AZNAR-MARTIN, J. High prevalence of community-acquired norovirus gastroenteritis among hospitalized children: a prospective study. **Clin Microbiol Infect**, n. 17, p. 1895–1899, 2011.

GRAHAM, D.Y., JIANG, X., TANAKA, T., OPEKUN, A.R., MADORE, H.P., ESTES, M.K. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. **J Infect Dis**, n. 170, p. 34-43, 1994.

GREEN, J., HENSHILWOOD, K., GALLIMORE, C.I., BROWN, D.W.G., LEES, D.N. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. **Appl Environ Microbiol**, n. 03. p. 858–863. 1998

GREEN, K.Y., LEW, J.F., JIANG, X., KAPIKIAN, A.Z., ESTES, M.K. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. **J Clin Microbiol**, n. 31, p. 2185–2191, 1993.

GREEN, K.Y., ANDO, T., BALAYAN, M.S., BERKE, T., CLARKE, I.N., ESTES, M.K., MATSON, D.O., NAKATA, S., NEILL, J.D., STUDDERT, M.J., THIEL, H-J. Taxonomy of the Caliciviruses. **J Infect Dis**, n. 181 (Suppl 2), p. 322–330. 2000.

GREEN, K.Y. **Caliciviridae: The Noroviruses**. In: KNIPE, D.M., GRIFFIN, D.E., LAMB, R.A., STRAUS, S.E., HOWLEY, P.M., MARTIN, M.A., ROIZMAN, B. *Fields Virology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007. p. 948-979.

GREENBERG, H.B., WYATT, R.G., VALDESUSO, J., KALICA, A.R., LONDON, W.T., CHANOCK, R.M., KAPIKIAN, A.Z. Solid-phase microtiter radioimmunoassay for detection of the Norwalk strain of acute nonbacterial epidemic gastroenteritis virus and its antibodies. **J Med Virol**, n. 2, p. 97–108, 1978.

GREENBERG, H.B., VALDESUSO, J., KAPIKIAN, A.Z., CHANOCK, R.M., WYATT, R.G., SZMUNESS, W., LARRICK, J., KAPLAN, J., GILMAN, R.H., SACK, D.A. Prevalence of antibody to the Norwalk virus in various countries. **Infect Immun**, n. 26. p. 270–273. 1979.

HALE, A., MATTICK, K., LEWIS, D., ESTES, M., JIANG, X., GREEN, J., EGLIN, R., BROWN, D. Distinct epidemiological patterns of Norwalk-like virus infection. **J Med Virol**, n.62, p.99–103, 2000.

HAN, M.G., SMILEY, J.R., THOMAS, C., SAIF, L.J. Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. **J Clin Microbiol**, n. 42, p. 5214–5224, 2004.

HAQ, T.A., MASON, H.S., CLEMENTS, J.D., ARNTZEN, C.J. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. **Science**, n. 268, p. 714–716, 1995.

HARDY, M.E. Norovirus protein structure and function. **FEMS Microbiol Lett**, n. 253, p. 1–8, 2005.

HARRINGTON, P. R., LINDESMITH, L. YOUNT, B., MOE, C.L., BARIC, R.S. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. **J Virol**, n. 23, p. 12335–12343, 2002.

HARRINGTON, P. R., VINJE, J., MOE, C.L., BARIC, R.S. Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions. **J Virol**, n. 78, p. 3035–3045, 2004.

HODGES, K., GILL, R. Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. **Gut Microbes**, n.1, p. 4–21, 2010.

HOFFMANN, D., SEEBACH, J., FOLEY, B.T., FRÖSNER, G., NADAS, K., PROTZER, U., SCHÄTZL, H.M. Isolated Norovirus GII.7 Strain Within an Extended GII.4 Outbreak. **J Med Virol**, n. 82, p. 1058–1064, 2010.

HOSUR, M.V., SCHMIDT, T., TUCKER, R.C., JOHNSON, J.E., GALLAGHER, T.M., SELLING, B.H., RUECKERT, R.R. Structure of an insect virus at 3.0 Å resolution. **Proteins**, n. 3, p. 167–176, 1987.

HSU, C.C., RILEY, L.K., WILLS, H.M., LIVINGSTON, R.S. Persistent Infection with and Serologic Crossreactivity of Three Novel Murine Noroviruses. **Comp Med**, n. 56, p. 247–251, 2006.

HUTSON, A.M., ATMAR, R.L., GRAHAM, D.Y., ESTES, M.K. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. **J Infect Dis**, n. 185, p. 1335–1337, 2002.

ITURRIZA-GÓMARA, M., XERRY, J., GALLIMORE, C.I., DOCKERY, C., GRAY, J. Evaluation of the Loopamp® (loop-mediated isothermal amplification) kit for detecting Norovirus RNA in faecal samples. **J Clin Virol**, n. 42, p. 389–393, 2008.

JIANG, X., GRAHAM, D.Y., WANG, K.N., ESTES, M.K. Norwalk virus genome cloning and characterization. **Science**, n. 250, p. 1580–1583, 1990.

JIANG, X., WANG, M., GRAHAM, D.Y., ESTES, M.K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. **J Virol**, n. 11, p. 6527–6532, 1992.

JIANG, X., WANG, M., WANG, K., ESTES, M. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. **Virol**, n. 195, p. 51–61, 1993.

JIANG, X., HUANG, P.W., ZHONG, W.M., FARKAS, T., CUBITT D.W., MATSON, D.O. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. **J Virol Methods**, n. 83, p. 145–154, 1999.

JOHANSEN, K., MANNERQVIST, K., ALLARD, A., ANDERSSON, Y., BURMAN, L.G., DILLNER, L., HEDLUND, K., JÖNSSON, K., KUMLIN, U., LEITNER, T., LYSÉN, M., THORHAGEN, M., TIVELJUNG-LINDELL, A., WAHLSTRÖMG, C., ZWEYGBERG-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**, n. 42, p.129–134, 2008.

JOHNSON, P.C., MATHEWSON, J.J., DUPONT, H.L., GREENBERG, H.B. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. **J Infect Dis**, n. 161, p. 18–21, 1990.

JOHNSTON, C.P., QIU, H., TICEHURST, J.R., DICKSON, C., ROSENBAUM, P., LAWSON, P., STOKES, A.B., LOWENSTEIN, C.J., KAMINSKY, M., COSGROVE, S.E., GREEN, K.Y., PERL, T.M. Outbreak Management and Implications of a Nosocomial Norovirus Outbreak. **Clin Infect Dis**, n. 45, p. 534-540, 2007.

KAGEYAMA, T., KOJIMA, S., SHINOHARA, M., UCHIDA, K., FUKUSHI, S., HOSHINO, F., 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**, n. 41, p. 1548-1557, 2003.

KAPIKIAN, A.Z., WYATT, R.G., DOLIN, R., THORNHILL, T.S., KALICA, A.R., CHANOCK, R.M. Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. **J virol**, n. 5, p. 1075-1081, 1972.

KAPIKIAN, A.Z., ESTES, M.K., CHANOCK, R.M. **Norwalk group of viruses**. In: FIELDS, B.N, KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., et al., eds. *Virology*. 3 ed. New York: Lippincott-Raven, 1996. p. 783–810.

KAPIKIAN, A.Z. The Discovery of the 27-nm Norwalk Virus: An Historic Perspective. **J Infect Dis**, n. 181 (Suppl 2), p. 295–302, 2000.

KAPLAN, J.E., FELDMAN, R., CAMPBELL, D.S., LOOKABAUGH, C., GARY, G.W. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. **Am J Public Health**, n. 72, p. 1329–1332, 1982.

KARST, S.M. Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA Viruses. **Viruses**, n. 2, p. 748-781, 2010.

KATAYAMA, K., HORIKOSHI-SHIRATO, H., KOJIMA, S., KAGEYAMA, T., OKA, T., HOSHINO, F., FUKUSHI, S., SHINOHARA, M., UCHIDA, K., SUZUKI, Y., GOJOBORI, T., TAKEDA, N. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. **Virology**, n. 299, p. 225–239, 2002.

KAWANO, G., OSHIGE, K., SYUTOU, S., KOTEDA, Y., YOKOYAMA, T., KIM, B., MIZUOCHI, T., NAGAI, K., MATSUDA, K., OHBU, K., MATSUIISHI, T. Benign infantile convulsions associated with mild gastroenteritis: A retrospective study of 39 cases including virological tests and efficacy of anticonvulsants. **Brain & Development**, n. 29, p. 617–622, 2007.

KHAMRIN, P., NGUYEN, T. A., PHAN, T.G., SATOU, K., MASUOKA, Y., OKITSU, S., MANEEKARN, N., NISHIO, O., USHIJIMA, H. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. **J Virol Methods**, n. 147. p. 360–363. 2008.

KHAN, R.R., LAWSON, A.D., MINNICH, L.L., MARTIN, K., NASIR, A., EMMETT, M.K., WELCH, C.A., UDALL Jr, J.N. Gastrointestinal Norovirus Infection Associated With Exacerbation of Inflammatory Bowel Disease. **J Ped Gastro Nutri**, n. 48, p. 328–333, 2009.

KIM, M., LEE, H., CHANG, K., KO, G. Molecular Characterization of Murine Norovirus Isolates from South Korea. **Virus Res**, n. 147, p. 1–6, 2010.

KIRBY, A., ASHTON, L., HART, I.J. Detection of norovirus infection in the hospital setting using vomit samples. **J Clin Virol**, n. 51, p. 86-87, 2011.

KIRKWOOD, C.D., STREITBERG, R. Calicivirus shedding in children after recovery from diarrhoeal disease. **J Clin Virol**, n. 43, p. 346–348, 2008.

KOJIMA, S., KAHEYAMA, T., FUKUSHI, S., HOSHINO, F.B., SHINOHARA, M., UCHIDA, K., NATORI, K., TAKEDA, N., KATAYAMA, K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. **J Virol Methods**, n. 100, p. 107–114, 2002.

KOOPMANS, M., VINJÉ, J., WIT, M., LEENEN, I., VAN DER POEL, W., DUYNHOVEN, Y.V. Molecular Epidemiology of Human Enteric Caliciviruses in The Netherlands. **J Infect Dis**, n. 181 (Suppl 2), p. 262–269, 2000.

KOOPMANS, M. Progress in understanding norovirus epidemiology. **Curr Opin Infect Dis**, n. 21, p. 544-552, 2008.

L'HOMME, Y., SANSREGRET, R., PLANTE-FORTIER, E., LAMONTAGNE, A.M., OUAR- DANI, M., LACROIX, G., SIMARD, C. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. **Virus Genes**, n. 39, p. 66–75, 2009.

LAMHOUEB, S., FLISS, I., NGAZOA, S.E., JEAN, J. Molecular study of the persistence of infectious human norovirus on food-contact surfaces. **Food Environ Virol**, n. 1, p. 51-56, 2009.

LAU, C.S., WONG, D.A., TONG, L.K. High rate and changing molecular epidemiology pattern of norovirus infections in sporadic cases and outbreaks of gastroenteritis in Hong Kong. **J Med Virol**, n. 73, p. 113–117, 2004.

LE, V.P., JUNG, Y.C., KANG, K.S., LIM, I, MYUNG, S.C., KIM, W. Genetic Characterization of Norovirus GII.4 2006b Variants From Jeju Island, South Korea. **J Med Virol**, n. 82, p. 1065–1070, 2010.

LEE, M.B., GREIG, J.D. A review of gastrointestinal outbreaks in schools: effective infection control interventions. **J Sch Health**, n. 12, p. 588-598, 2010.

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**, n. 9, p. 548-553, 2003.

LINDESMITH, L., MOE, C., LEPENDU, J., FRELINGER, J.A., TREANOR, J., BARIC, R.S. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. **J Virol**, n. 5. p. 2900-2909. 2005.

LINDESMITH, L., DONALDSON E.F. LOBUE A.D., CANNON, J.L., ZHENG, D.P., VINIE, J. BARAC, R.S. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. **PLoS Med**, n. 5, p. 269-288, 2008.

LIU, G., KAHAN, S.M., JIA, Y., KARST, S.M. Primary High-Dose Murine Norovirus 1 Infection Fails To Protect from Secondary Challenge with Homologous Virus. **J Virol**, n. 83, p. 6963–6968, 2009.

LOLE KS, BOLLINGER RC, PARANJAPPE RS, GADKARI D, KULKARNI SS, NOVAK NG. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype Cinfected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. **J Virol**, n. 1, p. 152–160, 1999.

LOPES, T.R., PINTO, M.A.O. Aplicação terapêutica de *Saccharomyces boulardii* em diarreias: uma revisão. **HU Revista**, n. 2, p. 107-122, 2010.

LOPMAN, B.A., REACHER, M.H., VIPOND, I.B., SARANGI, J., BROWN, D.W. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. **Clin Infect Dis**, n. 39, p. 318–324, 2004.

LOPMAN, B.A. Noroviruses: simple detection for complex epidemiology. **Clin Infect Dis**, n. 42. p. 970–971. 2006.

LOPMAN, B.A., HALL, A.J., CURNS, A.T., PARASHAR, U.D. Increasing rates of gastroenteritis hospital discharges in US adults and the contribution of norovirus, 1996-2007. **Infect Dis**, n. 52 p. 466-474. 2011.

LORROT, M, BON, F, EL HAJJE, M.J., AHO, S., WOLFER, M., GIRAUDON, H., KAPLON, J., MARC, E., RAYMOND, J., LEBON, P., POTHIER, P., GENDREL, D. Epidemiology and clinical features of gastroenteritis in hospitalised children: prospective survey during a 2-year period in a Parisian hospital, France. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, n. 30. p. 361-368. 2011.

MARIONNEAU, S., AIRAUD, F. BOVIN, N.V., LE PENDU, J., RUVOEN-CLOUET, N. Influence of the combined ABO, FUT2, and FUT3 polymorphism on susceptibility to Norwalk virus attachment. **J Infect Dis**, n. 6. p. 1071-1077. 2005.

MARKS, P.J., VIPOND, I.B., REGAN, F.M., WEDGWOOD, K., FEY, R.E., CAUL, E.O. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. **Epidemiol Infect**, n. 131, p. 727–736, 2003.

MARSHALL, J.A., HELLARD, M.E., SINCLAIR, M.I. Incidence and characteristics of endemic Norwalk-like virus-associated gastroenteritis. **J Med Virol**, n. 69, p. 568–578, 2003.

MARSHALL, J.A., BRUGGINK, L.D. The Dynamics of Norovirus Outbreak Epidemics: Recent Insights. **Int J Environ Res Public Health**, n. 8, p. 1141-1149, 2011.

MARSHALL, J.K., THABANE, M., BORGAONKAR, M.R., JAMES, C. Postinfectious Irritable Bowel Syndrome After a Food-Borne Outbreak of Acute Gastroenteritis Attributed to a Viral Pathogen. **Clin Gastro Hepatol**, n. 5, p. 457–460, 2007.

MARTELLA, V., CAMPOLO, M., LORUSSO, E., CAVICCHIO, P., CAMERO, M., BELLACICCO, A.L., DECARO, N., ELIA, G., GRECO, G., CORRENTE, M., DESARIO, C., ARISTA, S., BANYAI, K., KOOPMANS, M., BUONAVOGLIA, C. Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). **Emerg Infect Dis**, n. 13, p. 1071-1073, 2007.

MARTÍNEZ, N., ESPUL, C., CUELLO, H., ZHONG, W., JIANG, X., MATSON, D.O., BERKE, T. Sequence diversity of human caliciviruses recovered from children with diarrhea in Mendoza, Argentina, 1995-1998. **J Med Virol**, n. 2, p. 289-298, 2002.

MASON, H.S., BALL, J.M., SHI, J., JIANG, X., ESTES, M.K., ARNTZEN, C.J. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. **Proc Natl Acad Sci**, n. 93, p. 5335–5340, 1996.

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. **Virology J**, n. 8, p. 310, 2011.

MATSON, D.O., SZÜCS, G. Calicivirus infections in children. **Cur Opin Infect Dis**, n.16. p. 241–246. 2003.

MATSUI, S.M., GREENBERG, H.B. Immunity to Calicivirus Infection. **J Infect Dis**, n. 181 (Suppl 2), p. 331-335, 2000.

MATTISON, K., SHUKLA, A., COOK, A., POLLARI, F., FRIENDSHIP, R., KELTON, D., BIDAVID, S., FARBER, J.M. Human noroviruses in swine and cattle. **Emerg Infect Dis**, n. 13, p. 1184-1188, 2007.

MATTISON, K., GRUDESKI, E., AUK, B., CHAREST, H., DREWS, S.J., FRITZINGER, A., GREGORICUS, N., HAYWARD, S., HOUDE, A., LEE, B.E., PANG, X.L., WONG, J., BOOTH, T.F., VINJÉ, J. Multicenter comparison of two norovirus ORF2-based genotyping protocols. **J Clin Microbiol**, n. 47, p. 3927-3932, 2009.

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**, n. 1, p 69-74, 2006.

MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAGI, L.F., BRESEE, J.S., SHAPIRO, C., GRIFFIN P.M., TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg Infect Dis**, n.5. p. 607–625. 1999.

MENDES, Y.G. **Soroepidemiologia do vírus Norwalk e do astrovírus em crianças de Belém, Pará, Brasil**. 1997. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Pará. Belém, Pará.

MENTIS, A., BLACKWELL, C.C., WEIR, D.M., SPILIADIS, C., DAILIANAS, A., SKANDALIS, N. ABO blood group, secretor status and detection of *Helicobacter pylori* among patients with gastric or duodenal ulcers. **Epidemiol Infect**, n. 106, p. 221–229, 1991.

MEYER, E., EBNER, W., SCHOLZ, R., DETTENKOFER, M., DASCHNER, F.D. Nosocomial outbreak of norovirus gastroenteritis and investigation of ABO histo-blood group type in infected staff and patients. **J Hosp Infect**, n. 56, p. 64–66, 2004.

MOE, C.L., SAIR, A., LINDESMITH, L., ESTES, M.K., JAYKUS, L.A. Diagnosis of Norwalk Virus Infection by Indirect Enzyme Immunoassay Detection of Salivary Antibodies to Recombinant Norwalk Virus Antigen. **Clin Diag Lab Immunol**, n. 6, p. 1028–1034, 2004.

MORETTIN, P.A., TOLOI, C.M.C. *Análise de Séries Temporais*. São Paulo: Edgar, Blucher, 2004.

MORILLO, S.G., AUDREY, C., CARMONA, R.C.C., TIMENETSKY, M.C.S.T. Identification and Molecular Characterization of Norovirus in São Paulo State, Brazil. **Braz J Microbiol**, n. 39, p. 619–622, 2008.

MORILLO, S.G., LUCHS, A., CILLI, A., RIBEIRO, C.D., CALUX, S.J., CARMONA, R.C.C., TIMENETSKY, M.C.S.T. Norovirus 3rd Generation kit: An improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection. **J Virol Methods**, n. 173, p. 13–16, 2011.

MOROOKA, K. Convulsion and mild diarrhea. **Shonika (Tokyo)**, n. 23, p. 131–137, 1982.

MOUNTS, A.W., ANDO, T. KOOPMANS, M., BRESEE, J.S., NOEL, J., GLASS, R.I. Cold Weather Seasonality of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses. **J Infect Dis**, n. 181 (Suppl 2), p. 284–287, 2000.

MOYO, S.J., GRO, N., MATEE, M.I., KITUNDU, J., MYRMEL, H., MYLVAGANAM, H., MASELLE, S.Y., LANGELAND, N. Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. **BMC Pediatr**, n. 11. 2011.

MUMPHREY, S.M., CHANGOTRA, H., MOORE, T.N., HEIMANN-NICHOLS, E.R., WOBUS, C.E., REILLY, M.J., MOGHADAMFALAH, M., SHUKLA, D., KARST, S.M. Murine Norovirus 1 Infection Is Associated with Histopathological Changes in Immunocompetent Hosts, but Clinical Disease Is Prevented by STAT1-Dependent Interferon Responses. **J Virol**, n. 81, p. 3251–3263, 2007.

NAKAGOMI, T., CORREIA, J. B., NAKAGOMI, O., MONTENEGRO, F. M. U., CUEVAS, L. E., CUNLIFFE, N. A., HART, C. A. Norovirus infection among children with

acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. **Arch Virol**, n. 153, p. 957-960, 2008.

NAKAMURA, L.S., OLIVEIRA D.S., SILVA, P.F., LUCENA, M.S., MASCARENHAS, J.D.P., GUSMÃO, R.H.P., LINHARES, A.C., GABBAY, Y.B. Molecular characterization of calicivirus in feces of children with acute diarrhea, attending a public hospital, in Belém-Pará. In: XVII Encontro Nacional de Virologia, **Publicado em anais**. Campos do Jordão, 2006.

NATHANSON, N., MARTIN, J.R. The epidemiology of poliomyelitis: enigmas surrounding its appearance, epidemicity, and disappearance. **Am J Epidemiol**, n. 110, p. 672–692, 1979.

NAYAKA, M.K., CHATTERJEEA, D., NATARAJUA, S.M., PATIVADAA, M., MITRAA, U., CHATTERJEEB, M.K., SAHAB, T.K., SARKARB, 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**, n. 45, p. 223–229, 2009.

NIAID Biodefense Research. **Norovirus Infection**, Estados Unidos, 2007. Disponível em: <<http://www.niaid.nih.gov/topics/norovirus/Pages/default.aspx>>. Acesso em: 06/03/2011.

NOEL, J.S., FANKHAUSER, R.L., ANDO, T., MONROE, S.S., GLASS, R.I. Identification of a distinct common strain of “Norwalk-like viruses” having a global distribution. **J Infect Dis**, n.179. p. 1334–1344. 1999.

OKADA, M., OGAWA, T., YOSHIKAZUMI, 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**, n. 152, p. 2249–2252, 2007.

OLIVEIRA, C.S., GABBAY, Y.B., ISHAK, R., LINHARES, A.C.L. **Gastroenterites virais**. In: FARHAT, C.K., CARVALHO, E.S., CARVALHO, L.H.F.R., SUCCI, R.C.M. *Infectologia pediátrica*. 2.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998. p. 394 – 413.

OLIVER, S.L., ASOBAYIRE, E., DASTJERDI, A.M., BRIDGER, J.C. Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. **Virology**. N. 350, p. 240-250, 2006.

PAGOTTO, F., CORNEAU, N., MATTISON, K., BIDAWID, S. Development of a DNA microarray for the simultaneous detection and genotyping of noroviruses. **J Food Prot**, n. 71, p. 1434-41, 2008.

PANG, X.L., PREIKSAITIS, J. K., LEE, B. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. **J Clin Virol**, n. 33, p. 168-171, 2005.

PANG, X.L., PREIKSAITIS, J.K., WONG, S., LI, V., LEE, B.E. Influence of Novel Norovirus GII.4 Variants on Gastroenteritis Outbreak Dynamics in Alberta and the Northern Territories, Canada between 2000 and 2008. **Plos one**, n. 7. p. 1-8. 2010.

PARKER, S.P., CUBITT, W.D., JIANG, X.J., ESTES, M.K. Seroprevalence studies using a recombinant Norwalk virus protein enzyme immunoassay. **J Med Virol**, n. 42, p. 146–150, 1994.

PARKS, C.G., MOE, C.L., 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**, n. 58, p. 426-434, 1999.

PATEL, M.M., WIDDOWSON, M.A., GLASS, R.I., AKAZAWA, K., VINJÉ, J., PARASHAR, U.D. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. **Emerg Infect Dis**, n.8. p. 1224–1231. 2008.

PATEL, M.M., HALL, A.J., VINJÉ, J., PARASHAR, U.D. Noroviruses: A comprehensive review. **J Clin Virol**, n.44. p. 1–8. 2009.

PERDUE, K.A., GREEN, K.Y., COPELAND, M., BARRON, E., MANDEL, M., FAUCETTE, L.J., WILLIAMS, E.M., SOSNOVTSEV, S.V., ELKINS, W.R., WARD, J.M. Naturally Occurring Murine Norovirus Infection in a Large Research Institution. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, n. 46, p. 39–45, 2007.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: Teoria e prática**. 1ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1995, 596pp.

PERRY, J.W., TAUBE, S., WOBUS, C.E. Murine norovirus-1 entry into permissive macrophages and dendritic cells is pH-independent. **Virus Res**, n. 143, p. 125–129, 2009.

PHAN, T.G., KUROIWA, T., KANESHI, K., UEDA, Y., NAKAYA, S., NISHIMURA, S., YAMAMOTO, A., SUGITA, K., NISHIMURA, T., YAGYU, F., OKITSU, S., MÜLLER, W.E., MANEEKARN, N., USHIJIMA, H. Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIB among infants and children with diarrhea in Japan. **J Med Virol**, n. 78, p. 971–978, 2006.

PHAN, T.G., KANESHI, K., UEDA, Y., NAKAYA, S., NISHIMURA, S., YAMAMOTO, A., SUGITA, K., TAKANASHI, S., OKITSU, S., USHIJIMA, H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in noroviruses. **J Med Virol**, n. 79, p. 1388–1400, 2007.

PHILLIPS, G., TAM, C.C., CONTI, S. Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: improved estimates using viral load for norovirus diagnosis. **Am J Epidemiol**, n. 171, p. 1014–1022, 2010.

PRASAD, B.V.V., HARDY, M.E., DOKLAND, T., BELLA, J., ROSSMANN, M.G., ESTES, M.K. Atomic resolution structure of the Norwalk virus capsid. **Science**. n. 286, p. 287–290, 1999.

PRASAD, B.V.V., HARDY, M.E., ESTES, M.K. Structural Studies of Recombinant Norwalk Capsids. **J. Infect. Dis**, n. 181 (Suppl 2), p. 317–321, 2000.

PRINCE, D.S., ASTRY, C., VONDERFECHT, S., JAKAB, G., SHEN, F.M., YOLKEN, R.H. Aerosol transmission of experimental rotavirus infection. **Pediatr Infect Dis**, n. 5, p. 218–222, 1986.

RIBEIRO, L.R., GIUBERTI, R.S.O., BARREIRA, D.M.P.G., SAICK, K.W., LEITE, J.P.G., MIAGOSTOVICH, M.P., SPANO, L.C. Hospitalization due to norovirus and genotypes of

rotavirus in pediatric patients, state of Espirito Santo. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n. 103, p. 201-206, 2008.

ROHAYEM, J., MUNCH, J., RETHWILM, A. Evidence of recombination in the norovirus capsid gene. **J Virol**, n. 79, p. 4977–4990, 2005.

ROHAYEM, J. Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. **Clin Microbiol Infect**, n. 6, p. 524-527, 2009.

ROSSIGNOL, J.F., EL-GOHARY, M. Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double blind placebo controlled clinical trial. **Aliment Pharmacol Ther**, n. 24, p. 1423-1430, 2006.

RYMAN, K.D., KLIMSTRA, W.B., NGUYEN, K.B., BIRON, C.A., JOHNSTON, R.E. Alpha/Beta Interferon Protects Adult Mice from Fatal Sindbis Virus Infection and Is an Important Determinant of Cell and Tissue Tropism. **J Virol**, n. 74, p. 3366–3378, 2000.

SANTOS, G.E.O. **Cálculo amostral: calculadora on-line**. Disponível em: <<http://www.calculoamostral.vai.la>>. Acesso em: 09/08/2011.

SHEWHART, W.A. **Economic Control of Quality of Manufactured Product**, Princeton: Van Nostrand Reinhold, 1931.

SHIRATO, H., OGAWA, S., ITO, H., SATO, T., KAMEYAMA, A., NARIMATSU, H.I., ZHENG, X., MIYAMURA, T., WAKITA, T., ISHII, K., TAKEDA, N. Noroviruses Distinguish between Type 1 and Type 2 Histo-Blood Group Antigens for Binding. **J Virol**, n. 21, p. 10756–10767, 2008.

SIDDIQ, D.M., KOO, H.L., ADACHI, J.A., VIOLA, G.M. Norovirus gastroenteritis successfully treated with nitazoxanide. **J Infect**, n. 63, p. 394-397, 2011.

SIEBENGA, J. J., VENNEMA, H., RENCKENS, B., DE BRUIN, E., VAN DER VEER, B., SIEZEN, R. J., KOOPMANS, M. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. **J. Virol**, n. 81, p. 9932–9941, 2007.

SIEBENGA, J. J., VENNEMA, H., ZHENG, D.P., VINJÉ, J., LEE, B.E., PANG, X.L., HO, E.C., LIM, W., CHOUDEKAR, A., BROOR, S., HALPERIN, T., RASOOL, N.B., HEWITT, J., GREENING, G.E., JIN, M., DUAN, Z.J., LUCERO, Y., O'RYAN, M., HOEHNE, M., SCHREIER, E., RATCLIFF, R.M., WHITE, P.A., 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**, n. 200, p. 802-812, 2009.

SILVA, P.F., NAKAMURA, S.L., LUCENA, M.S., COSTA, I.V., GUSMÃO, H.P., GABBAY, Y.B. Detecção de calicivírus em fezes de crianças com e sem diarreia atendidas em um hospital público de Belém, Pará, Brasil. In: XIII Congresso Médico Amazônico. **Publicado em anais**. Belém. 2006.

SIQUEIRA, J.A.M., CARVALHO, T. C. N., ARAGÃO, G.C., SPADA, P. K. P., TEIXEIRA, D. M., LIMA, I. C. G., OLIVEIRA, D. S., SANTOS, M. C., MASCARENHAS, J. D. P., LINHARES, A. C., GABBAY, Y. B. Norovirus as Cause of Severe Gastroenteritis Among

Children Admitted in a Pediatric Hospital in Belém, Pará, Brazil. In: XXI Encontro Nacional de Virologia. **Publicado em anais**. Gramado. 2010a.

SIQUEIRA, J.A.M., NASCIMENTO, I. S., OLIVEIRA, D. S., SOARES, L. S., ARAGÃO G.C., GABBAY, Y. B. Caracterização molecular de calicivírus humano em amostras fecais de crianças atendidas em um posto de saúde de Belém, Pará entre os anos de 1998 e 2000. In: 62ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. **Publicado em anais**. Natal. Ciências do mar: herança para o futuro, 2010b.

SIQUEIRA, J.A.M., LINHARES, A.C., OLIVEIRA, D.S., SOARES, L.S., LUCENA, M.S.S., WANZELLER, A.L.M., MASCARENHAS, J.D.P., GABBAY, Y.B. Evaluation of third-generation RIDASCREEN enzyme immunoassay for the detection of norovirus antigens in stool samples of hospitalized children in Belém, Pará, Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, n. 4, p. 391-395, 2011.

SOARES, C.C., SANTOS, N., BEARD, R.S., ALBUQUERQUE, M.C.M., MARANHÃO, A.G., ROCHA, L.N., RAMÍREZ, M.L., MONROE, S.S., GLASS, R.I., GENTSCH, J. Norovirus Detection and Genotyping for Children with Gastroenteritis, Brazil. **Emerg Infect Dis**, n. 8, p. 1244-1246, 2007.

SOUZA, M., AZEVEDO, M.S.P., JUNG, K., CHEETHAM, S., SAIF, L.J. Pathogenesis and Immune Responses in Gnotobiotic Calves after Infection with the Genogroup II.4-HS66 Strain of Human Norovirus. **J Virol**, n. 82, p. 1777–1786, 2008.

SPACKOVA, M., ALTMANN, D., ECKMANNS, T., KOCH, J., KRAUSE, G. High level of gastrointestinal nosocomial infections in the german surveillance system, 2002-2008. **Infect Control Hosp Epidemiol**, n. 12, p. 1273-1278, 2010.

STRAUB, T., HONER ZU, B., OROSZ-COGLAN, P., DOHNALKOVA, A., MAYER, B., BARTHOLOMEW, R., VALDEZ, C., BRUCKNER-LEA, C., GERBA, C., ABBASZADEGAN, M., NICKERSON, C. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. **Emerg Infect Dis**, n. 13, p. 396–403, 2007.

SUBEKTI, D.S., TJANIADI, P., LESMANA, M., SIMANJUNTAK, C., KOMALARINI, S., DIGDOWIROGO, H., SETIAWAN, B., CORWIN, A.L., CAMPBELL, J.R., PORTER, K.R., OYOFO, B.A. Characterization of Norwalk-like virus associated with gastroenteritis in Indonesia. **J Med Virol**, n. 2. p. 253-258, 2002.

TACKET, C.O., MASON, H.S., LOSONSKY, G., ESTES, M.K., LEVINE, M.M., ARNTZEN, C.J. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. **J Infect Dis**, n. 182 (in press), 2000.

TAKANASHI, S., HASHIRA, S., MATSUNAGA, T., YOSHIDA, A., SHIOTA, T., TUNG, P.G., KHAMRIN, P., OKITSU, S., MIZUGUCHI, M., IGARASHI, T., USHIJIMA, H. Detection, genetic characterization, and quantification of norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. **J Clin Virol**, n. 44, p. 161–163, 2009.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood,

Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol Biol Evol**, n. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAN, M., HUANG, P., XIA, M., FANG, P.A., ZHONG, W., MCNEAL, M., WEI, C., JIANG, W., JIANG, X. Norovirus P Particle, a Novel Platform for Vaccine Development and Antibody Production. **J Virology**, n. 2, p. 753–764, 2011.

TEIXEIRA, D.M. **Deteccção de norovírus (NoVs) em amostras ambientais coletadas na região metropolitana de Belém, Pará, Brasil**. 2011. 48f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biologia). Universidade Federal do Pará. Belém, Pará.

TERLETSKAIA-LADWIG, E., EGGERS, M., ENDERS, M., REGNA, T.H.T. Epidemiological aspects of gastrointestinal infections. **Dtsch Med Wochenschr**, n. 136, p. 69-75, 2011.

TRUJILLO, A.A., McCAUSTLAND, K.A., ZHENG, D.P., HADLEY, L.A., VAUGHN, G., ADAMS, S.M., ANDO, T., GLASS, R.I., MONROE, S.S. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. **J Clin Microbiol**, n. 44, p. 1405-1412, 2006.

TSANG, O.T.Y., WONG, A.T.Y., CHOW, C.B., YUNG, R.W.H., LIM, W.W.L., LIU, S.H. Clinical characteristics of nosocomial norovirus outbreaks in Hong Kong. **J Hosp Infect**, n. 69, p. 135-140, 2008.

TU, E.T.V., NGUYEN, T., LEE, P., BULL, R.A., MUSTO, J., HANSMAN, G., WHITE, P.A., RAWLINSON, W.D., MCIVER, C.J. Norovirus GII.4 Strains and Outbreaks, Australia **Emerg Infect Dis**, n. 7, p. 1128-1129, 2007.

TU, E.T.V., BULL, R.A., GREENING, G.E., HEWITT, J., LYON, M.J., MARSHALL, J.A., MCIVER, C.J., RAWLINSON, W.D., WHITE, P.A. Epidemics of Gastroenteritis during 2006 Were Associated with the Spread of Norovirus GII.4 Variants 2006a and 2006b. **Clin Infect Dis**, n. 46, p. 413–420, 2008.

TURCIOS, R.M., WIDDOWSON, M.A., SULKA, A.C., MEAD, P.S., GLASS, R.I. Reevaluation of Epidemiological Criteria for Identifying Outbreaks of Acute Gastroenteritis Due to Norovirus: United States, 1998–2000. **Clin Infect Dis**, n. 42, p. 964–969, 2006.

TURCIOS, R.M., AXELROD, P., ST JOHN, K., BULLITT, E., DONAHUE, J., ROBINSON, N., FRISS, H.E. Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. **J Pediatr**, n. 153, p. 339–344, 2008.

UEDA, M., KISIELIUS, J.J., ROCHA, M., TIMENETSKY, M.C.S.T., TANAKA, H. Small round structured virus –SRVS, genogroup G2 in Baixada Santista (SP) – virus identification by IEM. In: Encontro Nacional de Virologia. **Publicado em anais**. São Lorenço. 1996.

USHIJIMA, H. Diagnosis and molecular epidemiology of viral gastroenteritis in the past, present and future. **Uirusu**, n. 01. p. 75-90. 2009.

VALONES, M.A.A., GUIMARÃES, R.L., BRANDÃO, L.A.C., SOUZA, P.R.E., CARVALHO, A.A.T., CROVELA, S. Principles and Applications of Polymerase Chain Reaction in Medical Diagnostic Fields: A Review. **Braz J Microbiol**, n. 40, p. 1-11, 2009.

VENNEMA, H., DE BRUIN, E., KOOPMANS, M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. **J Clin Virol**, n. 25. p. 233–235. 2002.

VICTORIA, M., COSTA, F.A.C., HEINEMANN, M.B., LEITE, J.P., MIAGOSTOVICH, M. Prevalence and Molecular Epidemiology of Noroviruses in Hospitalized Children with Acute Gastroenteritis in Rio de Janeiro. Brazil, 2004. **Pediatr Infect Dis J**, n. 7. p. 602-606. 2007.

VIDAL, R., ROESSLER, P., SOLARI, V., VOLLAIRE, J., JIANG, X., MATSON, D.O., MAMANI, N., PRADO, V., O'RYAN, M.L. Novel Recombinant Norovirus Causing outbreaks of Gastroenteritis in Santiago, Chile. **J Clin Microbiol**, n. 6, p. 2271–2275, 2006.

VINJÉ, J., HAMIDJAJA, R.A., SOBSE, M.D. 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**, n. 116. p. 109–117. 2004.

WARD, J.M., WOBUS, C.E., THACKRAY, L.B., EREXSON, C.R., FAUCETTE, L.G., BELLLOT, G., BARRON, E.L., SOSNOVTSEV, S.V., GREEN, K.Y. Pathology of Immunodeficient Mice With Naturally Occurring Murine Norovirus Infection. **Toxicol Pathol**, n. 34, p. 708–715, 2006.

WATERS, A., COUGHLAN, S., HALL, W.W. Characterization of a novel recombination event in the norovirus polymerase gene. **Virology**, n. 363, p. 11–14, 2007.

WHO. **World Health Organization, diarrhea.** Disponível em: <<http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/>>. Acesso em: 16/10/2011

WIDDOWSON, M.A., MONROE, S.S., GLASS, R.I. Are noroviruses emerging? **Emerg Infect Dis**, n. 11, p. 735–737, 2005.

WIEGERING, V., KAISER, J., TAPPE, D., WEISSBRICH, B., MORBACH, H., GIRSCHICK, H.J. Gastroenteritis in childhood: a retrospective study of 650 hospitalized pediatric patients. **Int J Infect Dis**, n. 15, p. e401-407, 2011.

WILHELMI DE CAL, I., ROMÁN, E., SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clin Microbiol Infect**, n. 4. p. 247-262. 2003.

WILHELMI DE CAL, I., REVILLA, A., DEL ALAMO, J.M., ROMÁN, E., MORENO, S., SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Evaluation of two commercial enzyme immunoassays for the detection of norovirus in faecal samples from hospitalised children with sporadic acute gastroenteritis. **Clin Microbiol Infect**, n. 13, p. 341-343, 2007.

WOBUS, C.E., KARST, S.M., THACKRAY, L.B., CHANG, K., SOSNOVTSEV, S.V., BELLLOT, G., KRUG, A., MACKENZIE, J.M., GREEN, K.Y., VIRGIN, H.W. Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages. **PLoS Biol**, n. 2, p. e432, 2004.

WOBUS, C.E., THACKRAY, L.B., VIRGIN, H.W. Murine Norovirus: a Model System To Study Norovirus Biology and Pathogenesis. **J Virol**, n. 80, p. 5104–5112, 2006.

WOLF, S., WILLIAMSON, W., HEWITT, J., LIN, S., RIVERA-ABAN, M., BALL, A., SCHOLES, P., SAVILL, M., GREENING, G.E. Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. **Vet Microbiol**, n. 133, p. 184-189, 2009.

WOLF, S., REETZ, J., OTTO, P. Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. **Arch Virol**, n. 156, p. 1143-1150, 2011.

WYATT, R.G., DOLIN, R., BLACKLOW, N.R., DUPONT, H.L., BUSCHO, R.F., THORNHILL, T.S., KAPIKIAN, A.Z., CHANOCK, R.M. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. **J Infect Dis**, n. 129, p. 709–714, 1974.

XAVIER, M.P.T.P., OLIVEIRA, S.A., FERREIRA, M.S.R., VICTORIA, M., MIRANDA, V., SILVA, M.F.M., STRINA, A., BARRETO, M.L., MIAGOSTOVICHT, M.P., LEITE, J.P.G. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. **Braz J Med Biol Res**, n. 42, p. 438-444, 2009.

YANG, S.Y., HWANG, K.P., WU, F.T., WU, H.S., HSIUNG, C.A., CHANG, W.C., LIN, J.S., YANG, S.C., HUANG, S.L., HUANG, Y.C. Epidemiology and clinical peculiarities of norovirus and rotavirus infection in hospitalized young children with acute diarrhea in Taiwan, 2009. **J Microbiol Immunol Infect**, n. 43. p. 506-514. 2010.

ZHENG, D., ANDO, T., FANKHAUSER, R.L., BEARD, R.S., GLASS, R.I., MONROE, S.S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virol**, n. 346. p. 312 – 323. 2006.

ZENG, S.Q., HALKOSALO, A., SALMINEN, M., SZAKAL, E.D., KARVONEN, A., VESIKARI, T. Norovirus gastroenteritis in young children receiving human rotavirus vaccine. Scandinavian. **J Infect Dis**, n. 42, p. 540–544, 2010.

ZENG, M., XU, X., ZHU, C., CHEN, J., ZHU, Q., LIN, S., JIE, Y., SHU, X., Clinical and Molecular Epidemiology of Norovirus Infection in Childhood Diarrhea in China. **J Med Virol**, n. 84, p.145–151, 2012.

APÊNDICE A: Modo de preparo das diversas soluções que foram utilizadas nos diferentes procedimentos laboratoriais e no tratamento das amostras.

SOLUÇÃO	REAGENTE	QUANTIDADE
EDTA 0,2M pH 8,0	EDTA - ácido etileno diamino tetracético	14,88 g
	Água destilada (q.s.p.)	200 ml
<u>Preparo:</u> Ajustar a pH 8,0 com NaOH 10 M antes de completar o volume final.		
EDTA 0,5M pH 8,0	EDTA - ácido etileno diamino tetracético	37,22 mg
	Água destilada (q.s.p.)	200 ml
<u>Preparo:</u> Ajustar a pH 8,0 com NaOH 1M antes de completar o volume final.		
Tris-HCl 0,1M pH 6,4	Tris HCl	7,88 g
	Água destilada (q.s.p.)	500 ml
<u>Preparo:</u> Ajustar a pH 6,4 com HCl PA antes de completar o volume final.		
Tampão Tris/HCl/Ca⁺⁺ 0,01M pH 7,2	Tris HCl	1,57 g
	Cloreto de Cálcio - CaCl ₂ - 0,0015M	0,22 g
	Água destilada (q.s.p.)	1000 ml
<u>Preparo:</u> Em um becker de vidro, adicionar os reagentes, homogeneizar até a completa diluição e ajustar o pH para 7,2 com ácido clorídrico (HCl) PA antes de completar o volume final. Aliquotar, autoclavar a 121°C/20 minutos e conservar a 4 °C.		
Sílica	Dióxido de silício	60,00 g
	Água destilada (q.s.p.)	500 ml
<u>Preparo:</u> Homogeneizar e deixar a sílica sedimentar por 24 horas. Desprezar 430 ml do sobrenadante por sucção e ressuspender a sílica em 500 ml de água destilada, sedimentar por 5 horas e desprezar 440 ml do sobrenadante. Adicionar ácido clorídrico a 37% em pequenos volumes até ajustar o pH para 2,0. Separar alíquotas de 10 ml em frascos de cor âmbar, autoclavar e estocar a temperatura ambiente.		
Tampão L6	Isotiocianato de guanidina	60,00 g
	Triton X-100	1,30 g
	EDTA 0,2M pH 8,0	11 ml
	Tris-HCl 0,1M pH 6,4 (q.s.p.)	50 ml

<u>Preparo:</u> Adicionar os reagentes a um becker, homogeneizar com agitador magnético em banho-maria a 56°C até completa dissolução e conservar a temperatura ambiente em frasco âmbar.		
Tampão L2	Isotiocianato de guanidina	60,00 g
	Tris-HCl 0,1M pH 6,4 (q.s.p.)	50 ml
<u>Preparo:</u> Adicionar os reagentes a um becker, homogeneizar com agitador magnético em banho-maria a 56°C e conservar a temperatura ambiente em frasco âmbar.		
AE	Tris HCl	0,157 g
	EDTA	0,0186 g
	Água destilada (q.s.p.)	100 ml
<u>Preparo:</u> Homogeneizar o Tris HCl em água destilada em agitador magnético. Depois de dissolvido, adicionar o EDTA e ajustar para pH 9,0.		
TBE 10X	Tris Base	108,00 g
	Ácido Bórico	55,00g
	EDTA 0,5M pH 8,0	40 ml
	Água destilada (q.s.p.)	1000 ml
<u>Preparo:</u> Homogeneizar as substancias listadas em água destilada com auxílio de agitador magnético até total dissolução das mesmas.		
TBE 1 X	TBE 10X	100 ml
	Água destilada (q.s.p.)	1000 ml
<u>Preparo:</u> Diluir o TBE 10 X em água destilada até a concentração final de 1 X.		
Gel de agarose a 1,5% Volume final: 70 ml	Agarose	1,05 g
	Tampão TBE 1X	70 ml
	SYBR Safe DNA Gel Stain	7,0 µl
<u>Preparo:</u> Dissolver por aquecimento em forno de microondas por 2 minutos e resfriar até 50°C. Acrescentar água destilada até completar o volume inicial de TBE 1X e acrescentar o SYBR Safe em recipiente plástico, homogeneizar e verter na cuba de eletroforese para polimerizar.		
Gel de agarose a 2,0% Volume final: 35 ml	Agarose	70 g
	Tampão TBE 1X	35 ml
	SYBR Safe DNA Gel Stain	3,5 µl
<u>Preparo:</u> Dissolver por aquecimento em forno de microondas por 1m30s e resfriar até 50°C. Acrescentar água destilada até completar o volume inicial de TBE 1X e acrescentar o SYBR Safe em recipiente plástico, homogeneizar e verter na cuba de eletroforese para polimerizar.		

APÊNDICE B: Protocolo de purificação de DNA a partir da extração do gel de agarose. Adaptado de QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN). Procedimento utilizando microcentrífuga.

- Recomendações antes de começar:
 1. Observar a cor amarela do Buffer QG que indica um $\text{pH} \leq 7,5$.
 2. Adicionar Etanol (96-100%) no Buffer PE antes do uso.
 3. Ajustar todas as etapas de centrifugação para 10.000 rpm, em temperatura ambiente (22°C).
 4. Adicionar a um tubo de 0,5 ml a quantidade necessária de Buffer EB (tampão de eluição). O mesmo deverá ser aquecido a 75°C em chapa-quente ou banho-maria. Essa quantidade depende do número de amostras que serão purificadas.

- Procedimento de purificação:
 1. Identificar e pesar tubos vazios e esterilizados de 1,5 ml.
 2. Aplicar o produto da PCR em um gel de agarose a 1%.
 3. Submeter à eletroforese horizontal obedecendo a regra da distância entre os eletrodos da cuba para calcular a voltagem (5 V para cada 1 cm).
 4. Após eletroforese, cortar a banda de interesse com o auxílio de um bisturí, retirando o máximo de agarose possível.
 5. Acondicionar a banda de agarose com o DNA de interesse no tubo previamente identificado e pesado.
 6. Realizar a diferença entre o peso do tubo contendo a banda, com o mesmo sem a banda, a fim de determinar o valor real da banda de agarose contida no tubo.
 7. Adicionar 3x o volume do Buffer QG para cada volume do peso da banda extraída.
 8. Incubar em banho-maria a 50°C por 10 minutos para dissolver toda a banda de agarose. Durante o período de incubação, agitar os tubos em aparelho tipo Vortex a cada 2-3 min.
 9. Após incubação, adicionar 1 volume de isopropanol para cada 1 volume de peso da banda e agitar em Vortex.
 10. Passar o conteúdo do tubo para as colunas do kit previamente identificadas.

11. Centrifugue as colunas por 1 minuto a 10.000 rpm. O conteúdo que atravessou a membrana da coluna e se depositou no tubo coletor da mesma deve ser pipetado e colocado novamente na coluna. Então repetir a centrifugação por 1 minuto adicional.
12. Adicione à coluna 500 µl de Buffer QG e centrifugue por 1 minuto a 10.000 rpm e descarte o conteúdo depositado no tubo coletor.
13. Para a lavagem, adicione 750 µl de Buffer PE na coluna e aguarde 5 minutos.
14. Centrifugue por 1 minuto a 10.000 rpm e descarte o conteúdo depositado no tubo coletor.
15. Para remover qualquer resquício de etanol e Buffer PE, centrifugue as colunas vazias por 1 minuto, porém à velocidade de 13.000 rpm.
16. Passe a coluna para um tubo limpo de 1,5 ml, sem tampa, para coletar o DNA purificado.
17. Adicionar o tampão de eluição (Buffer EB) quente bem ao centro da coluna, sem encostar no filtro. Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugar por 2 minutos a 13.000 rpm. Amostra com muito DNA deve ser eluída com 30 µl a 50 µl; àquelas com pouco DNA, eluir com 20 µl a 30 µl.
18. Após centrifugação, coletar o DNA purificado e acondicioná-lo à -20 °C.

APÊNDICE C: Protocolo de purificação de DNA a partir do produto da PCR. Adaptado de QIAquick PCR Purification Kit Protocol (QIAGEN). Procedimento utilizando microcentrífuga.

- Recomendações antes de começar:
 1. Observar a cor amarela do Buffer QG que indica um $\text{pH} \leq 7,5$.
 2. Adicionar Etanol (96-100%) no Buffer PE antes do uso.
 3. Ajustar todas as etapas de centrifugação para 10.000 rpm, em temperatura ambiente (22°C).
 4. Adicionar a um tubo de 0,5 ml a quantidade necessária de Buffer EB (tampão de eluição). O mesmo deverá ser aquecido a 75°C em chapa-quente ou banho-maria. Essa quantidade depende do número de amostras que serão purificadas.

- Procedimento de purificação:
 1. Adicionar 5x o volume do Buffer PB para cada volume da quantidade de PCR a ser purificada.
 2. Passar o conteúdo do tubo para as colunas do kit previamente identificadas.
 3. Centrifugue as colunas por 1 minuto a 10.000 rpm. O conteúdo que atravessou a membrana da coluna e se depositou no tubo coletor da mesma deve ser pipetado e colocado novamente na coluna. Então repetir a centrifugação por 1 minuto adicional.
 4. Para a lavagem, adicione 750 μl de Buffer PE na coluna.
 5. Centrifugue por 1 minuto a 10.000 rpm e descarte o conteúdo depositado no tubo coletor.
 6. Para remover qualquer resquício de etanol e Buffer PE, centrifugue as colunas vazias por 1 minuto, porém à velocidade de 13.000 rpm.
 7. Passe a coluna para um tubo limpo de 1,5 ml, sem tampa, para coletar o DNA purificado.
 8. Adicionar o tampão de eluição (Buffer EB) quente bem ao centro da coluna, sem encostar no filtro. Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugar por 2 minutos a 13.000 rpm. Amostra com muito DNA deve ser eluída com 30 μl a 50 μl ; àquelas com pouco DNA, eluir com 20 μl a 30 μl .
 9. Após centrifugação, coletar o DNA purificado e acondicioná-lo à -20°C .

ANEXOS

ANEXO A



Parecer de Aprovação nº 0032/2010
Protocolo CEP/IEC - Nº 0023/10
CAAE: 0024.0.072.000-10

Ananindeua/PA, 15 de outubro de 2010.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS

Projeto: “Prevalência e caracterização molecular de astrovírus e calicivírus humano em amostras fecais provenientes de crianças menores de três anos, atendidas em dois hospitais de Belém, Pará, Brasil, no período de maio/2008 a abril/2010”

Pesquisador Responsável: YVONE GABBAY MENDES

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epigrafe foi considerado **aprovado**.

Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório anual e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.

Atenciosamente,

MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
 Coordenador do CEP/IEC

ANEXO B



Parecer de nº 103/2011/CEP/IEC/SVS/MS
PROTOCOLO CEP/IEC - Nº 0023/10
CAAE: 0024.0.072.000-10
Ilma. Sra. Dra.
Yvone Gabbay Mendes
Investigadora principal do Projeto

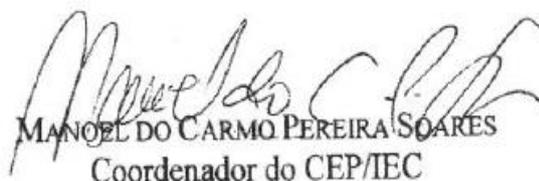
Ananindeua/PA, 29 de dezembro de 2011.

Senhora Coordenadora,

Em atenção à carta datada de 09 de dezembro de 2011, informamos a devida autorização por parte deste CEP para a utilização de 126 espécimes fecais adicionais no âmbito do projeto intitulado **“Prevalência e caracterização molecular de astrovírus e calicivírus humano em amostras fecais provenientes de crianças menores de três anos, atendidas em dois hospitais de Belém, Pará, Brasil, no período de maio/2008 a abril/2010”**.

2. Solicitamos que seja encaminhada a este CEP uma versão atualizada do referido projeto.

Atenciosamente,



MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC