



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

NAYARA DE SÁ OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA O
NOROVÍRUS HUMANO**

Salvador-Ba

2010

NAYARA DE SÁ OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA O
NOROVÍRUS HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora: Profa. Dra. Silvia Inês Sardi
Co-orientador: Prof. Dr. Gúbio Soares Campos**

**Salvador-Ba
2010**

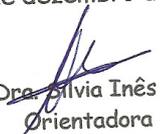


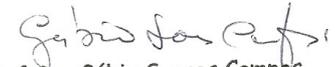
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

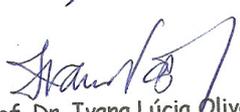


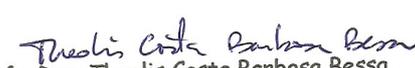
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO
DE DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA NAYARA DE SÁ OLIVEIRA

Aos vinte e nove dias do mês de dezembro do ano de dois mil e dez, às quatorze horas, no auditório III, 2º andar do Instituto de Ciências da Saúde, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. **Silvia Inês Sardi**, Orientadora, Dr. **Gúbio Soares Campos** Co-Orientador, Dra. **Ivana Lúcia Oliveira Nascimento**, Dra. **Theolis Costa Barbosa Bessa**, se reúne com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado: "Produção de Anticorpos Monoclonais para Norovírus Humano" da Mestranda **NAYARA DE SÁ OLIVEIRA**. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para Banca Examinadora conclui que a pós-graduanda teve a sua defesa de Dissertação APROVADA, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerra-se a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelas componentes da Banca examinadora, pela Mestranda e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação. Salvador, vinte e nove de dezembro do ano de 2010.


Prof. Dra. **Silvia Inês Sardi**
Orientadora


Prof. Dr. **Gúbio Soares Campos**
Co-Orientador


Prof. Dr. **Ivana Lúcia Oliveira Nascimento**
Banca Examinadora


Prof. Dra. **Theolis Costa Barbosa Bessa**
Banca Examinadora


Prof. Dra. **Silvia Lima Costa**
Coordenadora do PPGIm
ICS/UFBA


Nayara de Sá Oliveira
Mestranda

Aos meus pais, Gilvan e Zaide, pelo apoio incondicional
às minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

À minha amiga e Mestre Profa. Elisângela Campos, pelo exemplo de dedicação e comprometimento com a docência e pesquisa, e pelo estímulo e incentivo para que eu trilhasse esse caminho;

À Doutora Silvia Sardi, exemplo de pesquisadora, pelas valiosas contribuições a este trabalho, assim como à minha própria formação na área acadêmica;

Ao Doutor Gúbio Soares Campos, pela sua importante participação nesse projeto e por ter sempre acreditado em mim;

Ao Doutor Marcus Welby Borges Oliveira, pelas importantes considerações feitas;

Aos colegas do Laboratório de Virologia (ICS-UFBA), com destaque especial a Camila Brandão, pelos grandes ensinamentos nos procedimentos laboratoriais, e a Glauber Sena, pelo apoio e ajuda no laboratório;

Aos Professores do PPGIm, com especial atenção às Professoras Márcia Tosta Xavier e Maria de Fátima Dias Costa, pelos conselhos e palavras certas em alguns momentos de dificuldades;

Aos colegas do PPGIm, companheiros de jornada;

À Dilcéa Reis, por sua competência, carinho e cuidado com os alunos;

À minha sócia Tharita Cattai, por ter suportado todas as dificuldades que as minhas escolhas trouxeram para o nosso trabalho;

À Ara Ladeia, pela compreensão e apoio nos momentos onde a força me escapava;

À minha família, Nadinne, Gil, tios, primos, cunhados (as) e sobrinhos (as), pela aceitação da minha ausência nos momentos de confraternização;

À Guta Moura, grande amiga, pela revisão em língua inglesa;

À Doutora Adriana Lanfredi Rangel e Cláudio Pereira Figueira da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ);

À FAPESB e CAPES pelo apoio e investimento na minha formação profissional;

Aos funcionários da Oral Art Odontologia, por entenderem as limitações na minha disponibilidade de horário;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho;

Ao Grande Mestre do Universo, por ter me agraciado tanto e sempre.

“As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.”

Clarice Lispector

OLIVEIRA, Nayara de Sá. Produção de Anticorpos Monoclonais para o Norovírus Humano. Dissertação (Mestrado) — Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

RESUMO

O Norovírus (NoV), considerado uma das maiores causas de gastroenterite aguda não-bacteriana, é um vírus eliminado em pouca quantidade nas fezes e não cultivável em células, o que dificulta a obtenção de antígeno para produção de anticorpos monoclonais (AcM). Este trabalho propõe a obtenção desse antígeno diretamente de fezes, com uma metodologia de semi-purificação viral, através de filtrações esterilizantes e precipitação com polietileno glicol (PEG). O NoV precipitado com PEG manteve a sua antigenicidade, oferecendo excelentes condições para a produção e obtenção de seis AcM. Os AcM foram caracterizados pela técnica de Western Blot, onde foi demonstrada uma forte reatividade com uma banda de 60KDa, compatível com a proteína viral VP1, principal proteína que forma o capsídeo. Os AcM também foram capazes de detectar o vírus em amostras fecais coletadas de pacientes com gastroenterite aguda, utilizando-se a técnica de Dot-blot. O Dot-blot, quando comparado ao RT-PCR, padrão ouro para o diagnóstico do NoV, apresentou uma sensibilidade de 74% e especificidade de 47%. Este trabalho demonstra que os AcM reagiram fortemente com a proteína viral VP1 e que podem ser úteis na detecção do NoV nas fezes através da técnica de Dot-blot. Novos estudos devem ser realizados para verificar o potencial uso desses AcM para o diagnóstico do NoV.

PALAVRAS-CHAVE: Norovírus, gastroenterite, anticorpos monoclonais.

OLIVEIRA, Nayara de Sá. Production of Monoclonal Antibodies to Human Norovirus. Thesis (Masters) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2010.

ABSTRACT

Norovirus (NoV), considered a major cause of acute non-bacterial gastroenteritis is a virus shed in small amounts in feces and do not grow in cell culture, making it difficult to obtain antigen for producing monoclonal antibodies (Mabs). This work proposes to deliver this antigen directly from feces with a methodology for semi-viral purification through sterilizing filtration and precipitation with polyethylene glycol (PEG). NoV precipitated with PEG retained its antigenicity offering excellent conditions for production and acquisition of six Mabs. The Mabs were featured by Western blot technique, which was demonstrated a strong reactivity with a 60Ka band, consistent with the viral protein VP1, the major protein forming the capsid. The Mabs were also able to detect the virus in fecal samples collected from patients with acute gastroenteritis using the Dot-blot technique. The Dot-blot, compared to RT-PCR, the gold standard for diagnosis of NoV, had a sensitivity of 74% and specificity of 47%. This study demonstrates that the Mabs reacted strongly with viral VP1 protein and that it may be useful in NoV detection in feces by Dot-blot technique. Further studies should be performed to verify the potential use of these Mabs for the diagnosis of NoV.

KEYWORDS: Norovirus, gastroenteritis, monoclonal antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Organização genômica do NoV.....	19
Figura 2	Proteína VP1 e seus dois domínios	20
Figura 3	Modelo proposto por Bertolotti-Ciarlet para o mecanismo em que a VP2 estabiliza a proteína VP1 do capsídeo em VLPs	21
Figura 4	Árvore filogenética do NoV	25
Figura 5	Estratégias de replicação dos calicivírus	26
Figura 6	Precipitação com PEG	46
Figura 7	Recuperação da proteína viral	47
Figura 8	Processamento das amostras fecais para o Dot-blot	53
Figura 9	Esquema para detecção do antígeno viral em fezes humanas: Dot Blot	54
Figura 10	Perfil Eletroforético das proteínas virais	56
Figura 11	Corte no gel para recuperação da proteína pelo método SEM	57
Figura 12	Reatividade dos AcM com as proteínas virais: Western-blot	58
Figura 13	Reatividade dos AcM com as amostras concentradas com PEG: Dot-blot	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Interpretação do índice de Kappa de Cohen.....	55
Tabela 2	Comparação entre os resultados obtidos pela técnica do Dot-blot e a técnica de RT-PCR	59

LISTA DE ABREVIATURAS

AcM	Anticorpos monoclonais
DMSO	Óxido Metil Sulfônico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EM	Microscópio Eletrônico
EMI	Imunomicroscopia eletrônica
G	Aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s ²)
GSLs	Glicoesfingolipídios
HAT	Hipoxantina, Aminopterina, Timidina
HBGA	Histo-blood Group Antigens
HT	Hipoxantina, Timidina
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral
IFN	Interferon
LDLR	Receptor da Lipoproteína de Baixa Densidade
MNV	Norovírus Murino
NV	Vírus Norwalk
NoV	Norovírus
ORF	Open Reading Frame
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação de Cadeia da Polimerase
PEG	Polietileno Glicol

rNoV	Norovírus recombinante
RT-PCR	Reação de Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida contendo SDS
SFB	Soro Fetal Bovino
SRSV	Small Round Structured Viruses
STAT-1	Signal Transducer and Activator of Transcription-1
TEM	Imunomicroscopia eletrônica de transmissão
TEMED	Tetra Metil Etileno Diamina
TRIS	Hidroxi-Metil-Aminocetano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 HISTÓRICO	17
2.2 ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL	18
2.2.1 Morfologia	18
2.2.2 Organização Genômica	18
2.2.3 Proteínas Virais	19
2.2.3.1 Proteínas Estruturais	19
VP1	19
VP2	21
2.2.3.2 Proteínas Não-Estruturais	22
p48	22
p41 NTPase	22
p22	22
VPg	22
3CL ^{Pro}	23
RdRp	23
2.3 CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA	23
2.4 ESTRATÉGIAS DE REPLICAÇÃO	25
2.5 PATOGÊNESE	28
2.5.1 Entrada do vírus no hospedeiro e período de incubação	28
2.5.2 Sítio de Replicação Primário e Tropismo Celular	29
2.5.3 Infecção Sistêmica	30
2.5.4 Liberação do hospedeiro	31
2.6 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	32
2.7 IMUNIDADE E RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO	33
2.7.1 Imunidade Inata	34
2.7.2 Imunidade Adquirida	34
2.7.3 Determinantes Genéticos da Resistência do Hospedeiro	35
2.7.4 Candidatos à Vacina e Drogas Antivirais	37
2.8 EPIDEMIOLOGIA	38

2.8.1 Norovírus no Brasil	40
2.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	41
2.9.1 RT-PCR	41
2.9.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	42
3. OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL	45
4.1.1 Amostras de Fezes	45
4.1.2 Precipitação com PEG	45
4.1.3 Dosagem Protéica	46
4.1.4 Perfil Eletroforético do Antígeno Viral — SDS-PAGE	46
4.1.5 Análise e Identificação das Proteínas Virais	47
4.2 PRODUÇÃO DE AcM	48
4.2.1 Imunização	48
4.2.2 Fusão Celular	48
4.2.3 Detecção de clones produtores de AcM: ELISA	49
4.2.4 Clonagem dos Clones Produtores de AcM	50
4.2.5 Expansão e Manutenção dos Clones Produtores de AcM	50
4.2.6 Obtenção do Líquido Ascítico	51
4.2.7 Conservação das Células Hibridomas	51
4.3 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DOS AcM PARA O NoV	51
4.3.1 Reatividade contra as proteínas virais: Western blot	51
4.3.2 Detecção do antígeno viral: Dot-blot	52
4.3.3 Detecção do Antígeno Viral em Fezes Humanas: Dot-blot	52
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5. RESULTADOS	56
5.1 PERFIL ELETROFORÉTICO DO ANTÍGENO VIRAL	56
5.2 DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS VIRAIS NO PERFIL ELETROFORÉTICO	56
5.3 OBTENÇÃO DE AcM	57

5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS VIRAIS	
PELOS AcM — WESTERN BLOT	57
5.5 REATIVIDADE DOS AcM COM AS AMOSTRAS	
PRECIPITADAS COM PEG — DOT-BLOT	58
5.6 DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL DIRETAMENTE DE	
FEZES PELOS AcM (DOT-BLOT)	59
6. DISCUSSÃO	60
7. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXO 1.....	75

1. INTRODUÇÃO

O Norovírus (NoV), considerado uma das maiores causas de gastroenterite aguda não-bacteriana (ATMAR; ESTES, 2001), pertence a família *Caliciviridae* (CDC, 2001; HARDY, 2005). Morfologicamente, o NoV é composto por uma cápside com forma icosaédrica simétrica, formada por uma proteína principal VP1. É um vírus não envelopado, com um diâmetro de 27-40nm e contém uma fita simples de RNA poliadenilada, de polaridade positiva, de aproximadamente 7.7 kb (ATMAR; ESTES, 2001; HARDY, 2005; JIANG *et al.*, 1993).

Os anticorpos monoclonais (AcM) têm revolucionado as ciências biológicas, fornecendo reagentes específicos desde que foram inicialmente descritos em 1975 (KÖHLER; MILSTEIN, 1975), e sendo principalmente utilizados como importantes ferramentas de diagnóstico de vírus. A alta especificidade desses anticorpos e a sua produção em quantidades teoricamente ilimitadas (LADYMAN; RITTER, 1995) constituem uma grande vantagem para utilização dos mesmos. Entretanto, para uma produção eficiente de AcM, um passo de extrema importância é a escolha do antígeno capaz de induzir uma resposta imune. Os principais fatores a serem considerados na seleção do antígeno são o tamanho, heterogeneidade, natureza química, quantidade e conformação (LADYMAN; RITTER, 1995).

No caso do NoV, um vírus eliminado em pouca quantidade nas fezes e não cultivável em células, a obtenção desse antígeno se torna uma grande dificuldade. Os protocolos disponíveis para a produção de AcM contra o NoV utilizando antígenos recombinantes (KITAMOTO *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2009; SHIOTA *et al.*, 2007; YODA *et al.*, 2001, 2003), apresentam grande complexidade. Este trabalho propõe a obtenção do antígeno diretamente de fezes, com uma metodologia de semi-purificação viral, através de filtrações esterilizantes e precipitação com PEG. O NoV precipitado com PEG manteve a sua antigenicidade, oferecendo excelentes condições para a produção e obtenção de seis AcM.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

O vírus Norwalk (NV) foi descoberto em 1972, por Kapikian e colaboradores (KAPIKIAN *et al.*, 1972; KAPIKIAN, 2000). Material fecal obtido através de *swab* retal de um indivíduo doente envolvido num surto de gastroenterite numa escola elementar em Norwalk, Ohio, em outubro de 1968, foi administrado a adultos voluntários na forma de um filtrado livre de bactérias (KAPIKIAN, 2000). O material fecal desses voluntários foi examinado para evidenciar a presença de vírus através da técnica de imunomicroscopia eletrônica (IEM), que envolve a observação direta da formação do complexo antígeno-anticorpo através do microscópio eletrônico (EM) (GREEN, 2007). As partículas virais do NV eram pequenas e circulares, descritas com 27nm no seu menor diâmetro e 32nm no maior diâmetro. A técnica de IEM comprovou a associação entre as partículas do NV com a infecção e a doença, caracterizando o NV como agente etiológico do surto ocorrido em Norwalk, Ohio (KAPIKIAN *et al.*, 1972; KAPIKIAN, 2000). O NV tornou-se então a linhagem protótipo de um amplo grupo de vírus relacionados, inicialmente denominados “Norwalk-like-viruses” ou “small round structured viruses” (SRSVs), e conhecidos atualmente como Norovírus (NoV). Outras linhagens de NoV foram descritas, como o vírus Hawaii (oriundo de um surto de gastroenterite ocorrido em Honolulu, em 1971) e o vírus Snow Mountain (de um surto no Colorado, em 1976) descobertos em 1977 e 1982, respectivamente (GREEN, 2007). Em 1990, usando o vírus Norwalk parcialmente purificado de uma amostra fecal humana, Jiang e colaboradores realizaram a clonagem e caracterização inicial do RNA genômico (JIANG *et al.*, 1990), um importante avanço que estabeleceu a identidade desse vírus como um membro da família *Caliciviridae* (JIANG *et al.*, 1993). O Norovírus humano foi então inicialmente segregado em dois principais grupos filogenéticos que eram designados como genogrupo I (GI) e genogrupo II (GII), com o NV pertencente ao GI e o Hawaii e o vírus Snow Mountain pertencentes ao GII (GREEN, 2007).

2.2 ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL

2.2.1 Morfologia

O NoV, composto por um capsídeo com forma icosaédrica simétrica, é um vírus não envelopado, com um diâmetro de 27-40nm (ATMAR; ESTES, 2001), que contém uma fita simples de RNA poliadenilada de aproximadamente 7.7Kb (JIANG *et al.*, 1993). O capsídeo contém 90 dímeros da proteína principal (VP1) que formam uma concha de onde os capsômeros em forma de arco se projetam para fora (ATMAR; ESTES, 2001; GREEN, 2007; SCIPIONI *et al.*, 2008) .

2.2.2 Organização Genômica

Em 1990 o genoma do NoV foi clonado e caracterizado por Jiang e colaboradores. O NoV apresenta um genoma RNA de fita simples, com polaridade positiva e tamanho aproximado de 7.7Kb, contendo três ORFs (do inglês, *open reading frames*) ou “regiões de leitura aberta” (JIANG *et al.*, 1993). O genoma dos calicivírus, em geral, não apresenta na extremidade 5’ a estrutura *cap* característica dos RNA-m das células eucarióticas (CLARKE; LAMBDEN, 1997). Ao invés do *cap*, o genoma dos calicivírus é ligado a uma proteína na extremidade 5’, denominada proteína VPg, e na extremidade 3’ apresenta uma cauda poliadenilada. A ORF1, localizada na extremidade 5’, codifica uma poliproteína de 1738 resíduos de aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 195KDa (HARDY, 2005), precursora de pelo menos seis proteínas não-estruturais, e que sofre clivagem pela proteinase viral 3CLPro. A ORF2 codifica a proteína principal do capsídeo (VP1) com aproximadamente 60KDa (JIANG *et al.*, 1992) e a ORF3, localizada na extremidade 3’, codifica para a expressão de uma proteína estrutural menor (VP2) com peso molecular de aproximadamente 20KDa, que está envolvida na estabilidade da proteína VP1 do capsídeo (BERTOLOTTI-CIARLET *et al.*, 2003; SCIPIONI *et al.*, 2008). (Figura 1)



Figura1 — Organização genômica do NoV. VPg: proteína viral ligada ao genoma; p48: proteína p48; NTPase: nucleotídeo trifosfatase; 3CLPro: protease 3C-like; RdRp: RNA polimerase dependente de RNA; VP1: proteína principal do capsídeo; VP2: pequena proteína estrutural; ORF: regiões de leitura aberta. (SCIPIONI *et al.*, 2008)

2.2.3 Proteínas Virais

2.2.3.1 Proteínas Estruturais

O vírion do NoV é composto por 90 dímeros da proteína principal do capsídeo, VP1 e uma ou duas cópias da proteína estrutural menor, VP2. Vírus que contêm uma única proteína principal formando o capsídeo são raros entre os vírus animais, entretanto são mais comuns entre os vírus que infectam vegetais (HARDY, 2005).

VP1

A proteína VP1 apresenta aproximadamente 530 a 555 resíduos de aminoácidos, com peso molecular entre 58 e 60KDa (GREENBERG *et al.*, 1981; HARDY, 2005). Cento e oitenta cópias de VP1, organizadas em 90 dímeros, formam o capsídeo viral (HARDY, 2005). Essa proteína apresenta dois domínios, o domínio S, com uma sequência conservada de aminoácidos e o domínio P, formado por uma sequência variável de aminoácidos (PRASAD *et al.*, 1999) (Figura 2). O fato do domínio S apresentar uma sequência conservada entre os NoV possivelmente indica a importância dessa região para a integridade do capsídeo (BERTOLOTTI-CIARLET *et al.*, 2002). O domínio S, localizado na região N-terminal de VP1 e composto por 225 resíduos de aminoácidos, é responsável pela organização do interior em forma de concha do capsídeo. O domínio P na extremidade C-terminal forma as estruturas semelhantes a arcos que se estendem para fora da concha (PRASAD *et al.*, 1999), e se subdivide em dois sub-domínios P1 e P2 (PRASAD; HARDY; ESTES, 2000). O domínio P interage formando dímeros, estabilizando o capsídeo e formando as protruções características do vírus, observadas no microscópio eletrônico (ME) (HARDY, 2005; TAN; HEDGE; JIANG, 2004). Além de estabilizar a forma icosaédrica do capsídeo, é provável que o domínio P também controle o tamanho das partículas virais (BERTOLOTTI-CIARLET *et al.*, 2002). O sub-domínio P2 está

localizado na superfície do capsídeo, e apresenta uma região hipervariável, responsável pela antigenicidade do vírus e que define as diversas linhagens do NoV. Acredita-se que o sub-domínio P2 tenha um papel importante na interação com os receptores e com a resposta imune ao vírus (HARDY, 2005; TAN *et al.*, 2003).

A sequência de aminoácidos da proteína VP1 pode variar em mais de 60% entre os genogrupos, e de 20-30% entre os genótipos dentro de cada genogrupo (LINDESMITH *et al.*, 2008). Quando expressa em células de inseto a partir de baculovírus recombinante, a proteína VP1 forma partículas semelhantes ao vírus (VLPs, do inglês: *virus-like particles*), e essa montagem é independente do RNA ou da proteína VP2 (BERTOLOTTI-CIARLET *et al.*, 2002; JIANG *et al.*, 1992; TAUBE; KURTH; SCHREIER, 2005). A habilidade da automontagem da proteína VP1 em VLPs sem RNA sugere que as interações entre proteínas, mais do que entre RNA e proteína, sejam responsáveis pela correta montagem do capsídeo do NoV (WHITE *et al.*, 1996). A expressão da proteína do capsídeo em VLPs tem se mostrado uma importante ferramenta para o desenvolvimento de reagentes para diagnóstico, utilizados nos estudos epidemiológicos das infecções pelo Norovírus (CLARKE; LAMBDEN, 1997).

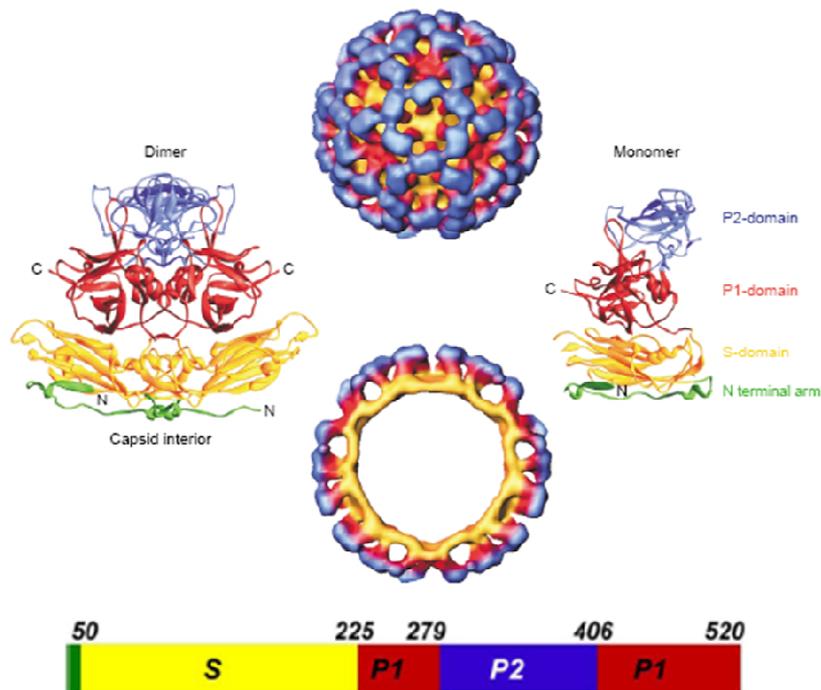


Figura 2 — A proteína VP1 com seus dois domínios, o domínio S, que forma a concha que envolve o genoma viral e o domínio P, com seus sub-domínios P1 e P2, formando os arcos que se projetam para fora. O domínio P2 é uma inserção de 127 aminoácidos no domínio P1, que se inicia no resíduo 279 e termina no resíduo 406 (GLASS *et al.*, 2000a).

VP2

A proteína VP2 é uma pequena proteína estrutural presente em uma ou duas cópias por vírion, com aproximadamente 208 a 268 resíduos de aminoácidos, peso molecular que varia de 22 a 29KDa, e que exibe uma grande variabilidade na sequência de aminoácidos entre os diferentes genótipos. (HARDY, 2005). A VP2 é uma proteína com caráter básico e ponto isoelétrico previsto de 10.99, o que leva à sugestão de que a VP2 se ligue ao RNA (GLASS *et al.*, 2000a) e que esteja envolvida no empacotamento do genoma (HARDY, 2005). Esse caráter básico pode ter uma função similar à extremidade básica N-terminal da proteína do capsídeo dos vírus que infectam vegetais, que estão envolvidos na ligação ao RNA, já que a extremidade N-terminal da VP1 tem um caráter ácido e não interage diretamente com o genoma (BERTOLOTTI-CIARLET *et al.*, 2003). Entretanto, não há até o momento nenhum experimento que descreva essa interação entre a VP2 e o RNA (HARDY, 2005). Segundo Bertolotti-Ciarlet (2003), a VP2 está relacionada com a expressão da proteína VP1 e a estabilidade do capsídeo (Figura 3).

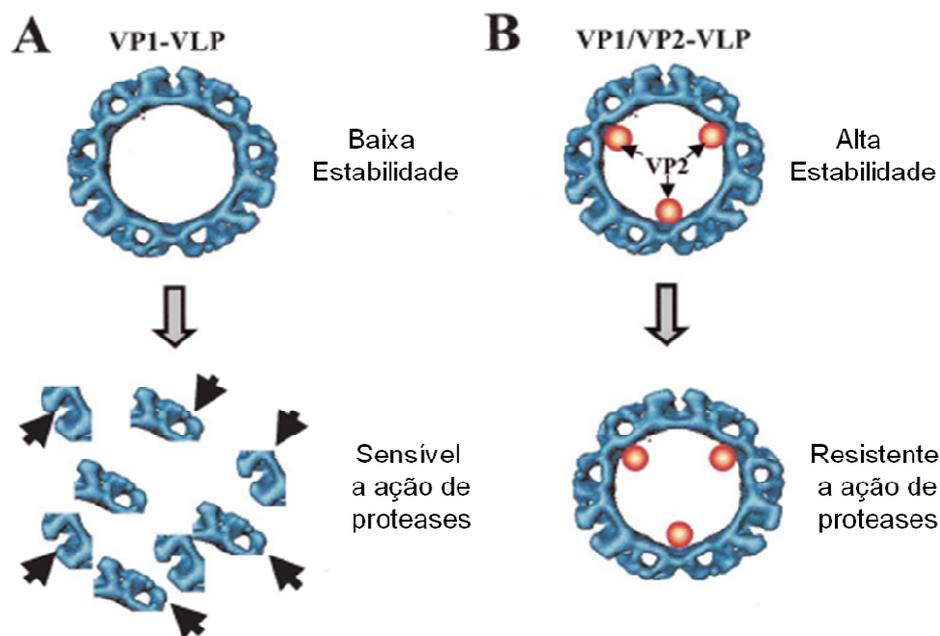


Figura 3 — Modelo proposto por Bertolotti-Ciarlet para o mecanismo em que a VP2 estabiliza a proteína VP1 do capsídeo em VLPs. Partículas compostas por VP1 e VP2 são mais estáveis do que aquelas compostas apenas de VP1. Portanto, partículas compostas apenas por VP1 (A) poderiam ser mais sensíveis aos vários tratamentos (pressão, calor, pH, ou mudanças na concentração iônica) do que aquelas que também contém a VP2 (B). Uma vez clivada, as proteínas solúveis de VP1 seriam mais sensíveis a degradação proteolítica (setas negras), devido à exposição de mais sítios de clivagem. (Adaptado de BERTOLOTTI-CIARLET *et al.*, 2003).

2.2.3.2 Proteínas Não-Estruturais

p48 (p37)

Proteína codificada na extremidade N-terminal da ORF1 e que apresenta uma variabilidade em tamanho e sequência de aminoácidos entre os vírus do genogrupo I (48KDa) e II (37KDa) (HARDY, 2005). Essa proteína pode apresentar um papel importante no trânsito intracelular de proteínas virais (ETTAYEBI; HARDY, 2003; SCIPIONI *et al.*, 2008). Fernandez-Vega e colaboradores (2004) sugerem que esta proteína esteja relacionada com a interação do NoV com o complexo de Golgi e apresente um papel na indução do rearranjo das membranas intra-celulares, associada com a replicação do RNA viral.

p41 (p40) NTPase

Apresenta peso molecular de 41KDa nos vírus do genogrupo GI e de 40KDa naqueles pertencentes ao genogrupo GII. Essa proteína apresenta capacidade de hidrolisar ATP, porém é incapaz de desenrolar uma fita de RNA, ou seja, não apresenta uma atividade de helicase (HARDY, 2005).

p22 (p30)

Proteína supostamente envolvida no trânsito da membrana celular e em complexos de replicação (SCIPIONI *et al.*, 2008).

VPg

A VPg é uma proteína de aproximadamente 15KDa, covalentemente ligada ao genoma e ao RNAm. Evidências experimentais para essa ligação são conhecidas somente nos calicivírus animais (BURROUGHS; BROWN, 1978), embora seja provável que o mesmo aconteça com o NoV (HARDY, 2005). É sabido que o genoma dos calicivírus desprovido da VPg não é infeccioso (BURROUGHS; BROWN, 1978). Experimentos diretos com calicivírus felino (FCV) sugerem um papel da VPg na tradução do RNA viral, isto é, foi proposto que a VPg poderia ter um papel no recrutamento dos ribossomos pelo RNA viral (HARDY, 2005).

Katayama e colaboradores (2006) também sugerem a possibilidade da VPg regular os eventos iniciais da transcrição e tradução do RNA viral. Entretanto, o papel exato da proteína VPg na replicação do norovírus permanece obscura. Segundo Asanaka e colaboradores (2005), a VPg é expressa a partir do RNA genômico e representa um papel importante para o sucesso da replicação, tradução e empacotamento do genoma em partículas virais. Em 2007, Guix e colaboradores observaram que o tratamento prévio do RNA selvagem viral com proteinase K abolia completamente a expressão protéica após a trans-infecção em células de hepatoma humano (células Huh-7), sugerindo que a VPg desempenhe um papel importante na infectividade e expressão do genoma do norovírus, assim como descrito para calicivírus animais (GUIX *et al.*, 2007).

3CL^{Pro}

A denominação dessa protease se dá pela semelhança com a proteína 3C do picornavírus (HARDY, 2005). Sua função é a clivagem da poliproteína codificada pela ORF1, dando origem as proteínas não-estruturais do norovírus (SCIPIONI *et al.*, 2008).

RdRp

A RNA polimerase dependente de RNA do norovírus se estende do aminoácido 1281 até a extremidade carboxi-terminal da ORF1 e apresenta elementos estruturais e catalíticos similares a outras RdRp dos vírus RNA de polaridade positiva (HARDY, 2005). Análises cristalográficas demonstraram que a extremidade carboxi-terminal dessa proteína repousa numa fissura que forma um sítio ativo. A localização desse segmento carboxi-terminal pode permitir que essa parte da proteína desempenhe um papel importante na iniciação da síntese do RNA viral (ESTES *et al.*, 2006).

2.3 CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA

A classificação dos calicivírus era baseada, inicialmente, na morfologia dos vírus (SCIPIONI *et al.*, 2008). Nos anos 70 e 80 a classificação se devia exclusivamente a métodos imunológicos envolvendo amostras clínicas humanas como fonte de

antígenos e anticorpos (ANDO; NOEL; FRANKHAUSER, 2000). Após a clonagem e caracterização do genoma em 1990, a técnica de RT-PCR e o sequenciamento do genoma se tornaram os principais mecanismos para caracterizar esses vírus e entender o parentesco entre as diferentes linhagens (ANDO; NOEL; FRANKHAUSER, 2000; JIANG *et al.*, 1990; ZHENG *et al.*, 2006). Em 1998, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) propôs uma nova classificação e nomenclatura para os calicivírus, que foi posteriormente atualizada (SCIPIONI *et al.*, 2008). O Norovírus constitui um gênero da família *Caliciviridae* de vírus RNA com polaridade positiva que inclui três gêneros adicionais (CDC, 2001; HARDY, 2005). A família *Caliciviridae* inclui quatro gêneros: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Lagovirus* e *Versivirus*. Os dois últimos são, até o momento, exclusivos de animais, enquanto que *Norovirus* e *Sapovirus* infectam principalmente seres humanos (BORGES; CARDOSO, 2005). Cada gênero foi denominado a partir de uma doença sintomática (lesões vesiculares — *Versivirus*), do hospedeiro infectado (lagomorfos — *Lagovirus*) ou pela localização geográfica onde a espécie foi isolada (Sapporo, Japão — *Sapovirus*; Norwalk, EUA — *Norovirus*). Mais recentemente foi sugerido um quinto gênero que infecta bovinos, provisoriamente denominado *Nabovirus* ou *Becovirus* (OLIVER *et al.*, 2006).

O gênero *Norovirus* se divide em cinco genogrupos (GI-V) (GREEN *et al.*, 2000). Linhagens de três genogrupos GI, GII e GIV infectam principalmente humanos (GII/11 infecta porcos), e GIII e GV infectam bovinos e ratos, respectivamente (ZHENG *et al.*, 2006). Em 2006, Zheng e colaboradores propuseram um método padronizado para classificação das cepas de NoV dentro de cada genogrupo, que utilizava a sequência de aminoácidos da principal proteína do capsídeo como critério para a nomenclatura do NoV (SCIPIONI *et al.*, 2008). Os dois maiores clados, GI e GII, incluem a maioria das cepas mais comuns e variadas dos NoVs e são segregados em oito grupos (ou *clusters*) para GI e 17 grupos para GII. Outro genogrupo com linhagem que infecta humanos, o GIV, apresenta apenas um único grupo. Os genogrupos de NoV bovino (GIII) e murino (GV) apresentam 2 e 1 grupo, respectivamente (Figura 4) (ZHENG *et al.*, 2006). O vírus Norwalk, protótipo do gênero, pertence ao genogrupo I, cluster 1 (GI.1) (ATMAR; ESTES, 2006). As cepas são identificadas como pertencentes a um mesmo *cluster* (genótipo) se elas codificarem mais de 80% da sequência idêntica de aminoácidos no gene completo

do capsídeo ou se codificarem mais de 85% ou 90% da sequência de aminoácidos para o GI e GII, respectivamente, no gene da RdRp (IKE *et al.*, 2006).

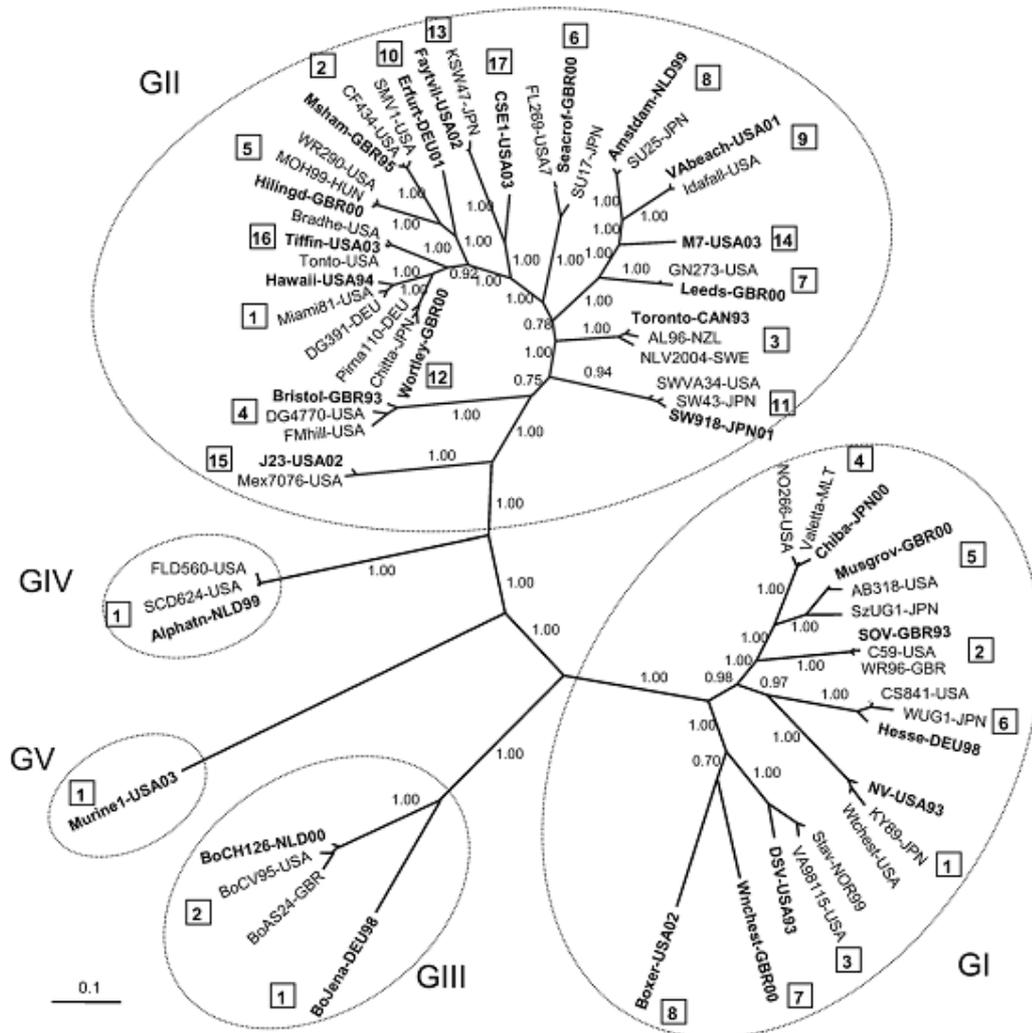


Figura 4 — Árvore filogenética do Norovírus proposta por Zheng e colaboradores (ZHENG *et al.*, 2006).

2.4 ESTRATÉGIAS DE REPLICAÇÃO

A estratégia de replicação dos calicivírus é bem semelhante àquelas dos outros vírus RNA de polaridade positiva (Figura 5). Inicialmente, o vírus interage com a célula hospedeira através de receptores específicos, depois ocorre a penetração da partícula viral com o consequente desnudamento do genoma no citoplasma. Em seguida, ocorre a tradução e replicação do genoma, culminando com a maturação e liberação das partículas virais através da membrana plasmática (GREEN, 2007).

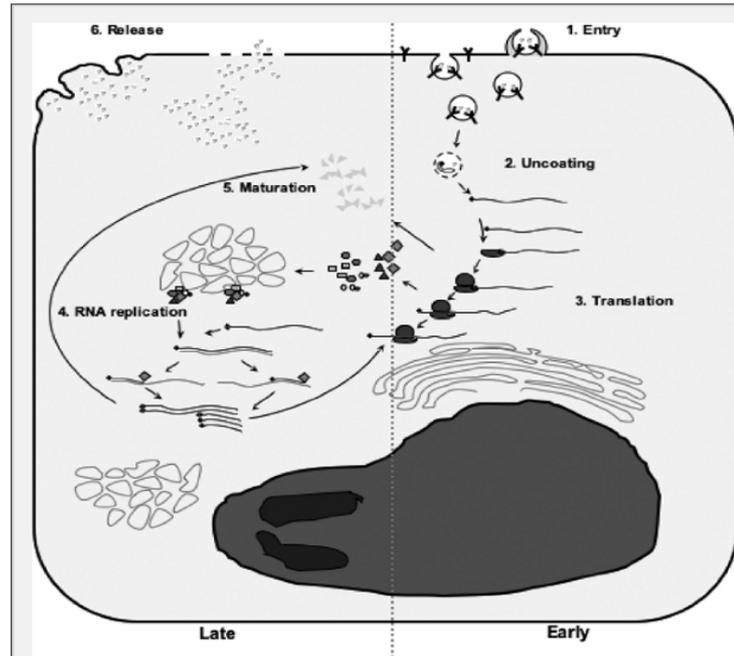


Figura 5 — Diagrama esquemático da estratégia de replicação dos calicivírus, consistente com a replicação de outros vírus RNA de polaridade positiva. O ciclo de replicação dos calicivírus envolve as seguintes fases: 1. Penetração; 2. Desnudamento; 3. Tradução do genoma viral; 4. Replicação do RNA viral; 5. Maturação; 6. Liberação das partículas virais (GREEN, 2007).

O primeiro passo no ciclo infeccioso viral é a interação do vírus com a membrana celular do hospedeiro (WHITE *et al.*, 1996). Entretanto, em se tratando dos calicivírus, esses eventos iniciais não estão completamente elucidados (GREEN, 2007). Em 1996, White e colaboradores utilizaram VLPs para avaliar a interação e internalização dessas partículas em diferentes linhagens celulares. Enquanto as VLPs foram capazes de interagir especificamente com várias linhagens celulares, inclusive células intestinais humanas (células Caco-2), somente uma porção das partículas foi internalizada pelas células. Os autores sugerem que esses resultados podem ser consequência da inabilidade dos sistemas de cultivo de células disponíveis em simular o ambiente *in vivo* e o estágio terminal de diferenciação celular requerido para uma interação e penetração produtiva do NoV na célula do hospedeiro. Ademais, os autores propõem a existência de um domínio específico de reconhecimento na proteína do capsídeo (WHITE *et al.*, 1996). Estudos recentes demonstraram que o domínio P da proteína VP1 que forma o capsídeo contém elementos essenciais para se caracterizar como receptor de ligação com a célula hospedeira, devido à alta variabilidade na sequência de aminoácidos quando comparado a outras regiões da proteína do capsídeo (PRASAD *et al.*, 1999; TAN; HEDGE; JIANG, 2004). Vários estudos demonstraram que o NoV deve reconhecer

os antígenos de grupos sanguíneos (HGBA, do inglês *histo-blood group antigens*) como receptores na superfície celular (HARRINGTON *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2003; HUTSON *et al.*, 2003; MARIONNEAU *et al.*, 2002). Antígenos de grupos sanguíneos são carboidratos complexos presentes na porção externa de glicolipídios e glicoproteínas, que também podem estar presentes como oligossacarídeos livres em fluidos biológicos (MARIONNEAU *et al.*, 2002). A expressão de HGBA é regulada por vários genes que determinam a via biossintética específica que estabelece os fenótipos ABO, Lewis e secretor. Os genes FUT1, FUT2 e FUT3 codificam as enzimas que glicosilam de forma sequencial os distintos precursores desses antígenos (FERNÁNDEZ; GÓMES, 2010; LINDESMITH *et al.*, 2003; MARIONNEAU *et al.*, 2002). O NoV se liga a HGBAs presentes nas células do epitélio intestinal e na saliva de indivíduos secretores, mas não daqueles não secretores. (MARIONNEAU *et al.*, 2002). Indivíduos “secretores” (Se+) são aqueles que expressam o gene FUT2 que codifica a enzima α -1,2-fucosiltransferase, e os indivíduos “não-secretores” (Se-) são aqueles que apresentam mutações inativadoras neste mesmo gene (FERNÁNDEZ; GÓMES, 2010; LINDESMITH *et al.*, 2003; MARIONNEAU *et al.*, 2002). A sugestão de que o NoV possa reconhecer um receptor nas células intestinais é baseado na habilidade de partículas recombinantes do NoV (rNoV VLPs) se ligarem e serem conseqüentemente internalizadas pelas células Caco-2, uma linhagem celular de carcinoma de cólon humano (MARIONNEAU *et al.*, 2002; WHITE *et al.*, 1996).

Apesar da clonagem do genoma viral a partir de 1990, estudos moleculares da replicação do NoV têm sido dificultados devido à ausência de um sistema adequado de cultura *in vitro*, e um modelo experimental animal (ASANAKA *et al.*, 2005). Devido a essa carência de um sistema de cultura, o ciclo replicativo do NoV humano tem sido inferido a partir de estudos com outros calicivírus animais que possam se replicar em cultura de células de mamíferos (GUIX *et al.*, 2007). Estudos recentes com o norovírus murino (MNV), único norovírus cultivável em células e em pequenos animais, têm esclarecido alguns pontos em relação aos mecanismos básicos de replicação viral em tecidos e a patogênese em hospedeiros naturais. O MNV apresenta várias similaridades com o NoV humano, como por exemplo, tamanho, forma e densidade de flutuação (WOBUS; THACKRAY; VIRGIN, 2006). Estudos com o modelo MNV em cultura de células de mamíferos revelaram que um RNA

subgenômico, poliadenilado na extremidade 3', é produzido nas células infectadas e é provável que tanto esse RNA subgenômico, quanto o RNA genômico estejam covalentemente ligado a proteína não estrutural VPg, na extremidade 5' (ASANAKA *et al.*, 2005; WOBUS; THACKRAY; VIRGIN, 2006). Após a infecção das células, as proteínas não-estruturais são expressas pelo RNA genômico e formam um complexo de replicação com o próprio RNA, o que gera novas moléculas do RNA genômico, assim como moléculas de RNA subgenômico, que codificam as proteínas estruturais VP1 e VP2 (ASANAKA *et al.*, 2005; GUIX *et al.*, 2007). Após a expressão das proteínas estruturais pelas moléculas de RNA subgenômico, o capsídeo é montado e o RNA viral é empacotado antes da liberação do vírus (GUIX *et al.*, 2007). Um fato interessante, e ainda não totalmente elucidado, é a observação feita por Chang (2009) de que a via do colesterol é importante na replicação do NoV. Embora o autor não proponha uma explicação clara para os achados, é possível que o receptor para a lipoproteína de baixa densidade (LDLR) atue como um co-fator essencial no complexo de replicação viral.

2.5 PATOGÊNESE

O entendimento da patogênese do NoV humano tem sido dificultado pela inabilidade da propagação do vírus *in vitro* (DUIZER *et al.*, 2004; MALIK *et al.*, 2005). Embora a maioria dos norovírus tenha sido associada à doença gastrointestinal em humanos, norovírus em bovinos, porcos e camundongos também foram identificados (WOBUS; THACKRAY; VIRGIN, 2006). Desses modelos experimentais em potencial, apenas o NoV murino se replica em cultura de células e em pequenos animais (WOBUS *et al.*, 2004; WOBUS; THACKRAY; VIRGIN, 2006).

2.5.1 Entrada do vírus no hospedeiro e período de incubação

A principal rota de entrada do vírus é pela via oral. O vírus é ácido-resistente, consistente com a habilidade de sobreviver à passagem pelo estômago (GREEN, 2007). Observações epidemiológicas sugerem a transmissão pela inalação e consequente deglutição de partículas virais contidas nos aerossóis do vômito, principalmente nos casos em que o vômito é projetado em espaços confinados (CAUL, 1994; MARKS *et al.*, 2000). Frequentemente, durante um surto, os casos

primários resultam de uma exposição a veículos contaminado com fezes (água ou alimentos), enquanto que os casos secundários e terciários resultam da transmissão entre pessoas (CDC, 2001). Os alimentos podem ser contaminados através de manipuladores de alimentos infectados ou por via externa, como por exemplo, moluscos (RONVEAUX *et al.*, 2000), já que o consumo de ostras e moluscos crus, ou insuficientemente cozidos no vapor, está relacionado com um maior risco a infecção pelo NoV (BERG *et al.*, 2000, THORTON; JENNINGS-CONKLIN; McCOMICK, 2004). As ostras são muitas vezes origem de diversos surtos pelo NoV, porque curiosamente expressam carboidratos nos seus tecidos digestivos, relacionados com alguns HBGAs, onde o NoV humano pode se ligar, o que leva a disseminação do vírus pela ingestão desse molusco (SCIPIONI *et al.*, 2008). A contaminação secundária entre pessoas é facilitada pelo confinamento em ambientes fechados e níveis reduzidos de higiene pessoal. Essa contaminação ocorre geralmente através do contato com as mãos, com a pele contaminada por resíduos fecais, através de fômites (qualquer objeto contaminado, como por exemplo, maçaneta da porta e brinquedos) ou através de aerossóis ou respingos de material infeccioso a partir de lençóis e roupas sujas (CHRIS, 2003). A ocorrência frequente desse vírus em surtos sugere uma alta infectividade, já que a exposição a um número pequeno de partículas pode estar associada a altas taxas de infecção (GLASS *et al.*, 2000b), e que a passagem através do hospedeiro humano não altera essa infectividade (TEUNIS *et al.*, 2008). O período de incubação é curto, variando de 12 a 48 horas (CDC, 2001). A infecção por NoV é autolimitada em pacientes imunocompetentes, com um período de duração de 24 a 48 horas (KAPLAN *et al.*, 1982), podendo chegar a três dias (O'NEILL *et al.*, 2001).

2.5.2 Sítio de Replicação Primário e Tropicismo Celular

O sítio de replicação do NoV não está bem estabelecido, mas admite-se que o vírus se replique na porção superior do trato intestinal (GREEN, 2007). Estudos realizados na década de 70, com infecção experimental em voluntários saudáveis, foram as primeiras descrições histopatológicas observadas no intestino delgado (TROEGER *et al.*, 2009). Biópsias do jejuno de indivíduos que desenvolveram gastroenterite após administração oral do NoV exibiram lesões histopatológicas como: desorganização das células epiteliais, achatamento das vilosidades, vacuolização do citoplasma e

infiltração da lâmina própria por células mononucleares. Aumento no número de corpos lisossomais e dilatação do retículo endoplasmático também foram observados. As atividades das enzimas fosfatase alcalina e trealase foram significativamente reduzidas durante a fase aguda da doença, mas retornaram aos níveis basais duas semanas após a doença. Foi também observada uma má absorção transitória de D-xylose, gordura e lactose durante a infecção. (AGUS *et al.*, 1973). O esvaziamento gástrico encontra-se retardado durante a doença, e a redução da motilidade gástrica pode ser responsável pelas náuseas e vômitos associados com a gastroenterite (GLASS; PARASHAR; ESTES, 2009). Recentemente, Cheetham e colaboradores (2006), e Souza e colaboradores (2008) descreveram a patogênese da infecção do norovírus humano em porcos e bezerros gnotobióticos, respectivamente. Eles confirmaram o sítio de replicação como sendo os enterócitos da porção proximal do intestino delgado. Entretanto, as lesões histopatológicas foram mais significativas nos experimentos com bezerros (SOUZA *et al.*, 2008) do que com porcos gnotobióticos (CHEETHAM *et al.*, 2006). Em 2009, Troeger e colaboradores apresentaram dados morfológicos, funcionais e de biologia molecular na infecção por norovírus em indivíduos imunocompetentes. Os principais achados na biópsia do duodeno foram redução da área de superfície das vilosidades, paralelo ao infiltrado intra-epitelial de linfócitos CD8⁺, o que corrobora com os achados de Agus em 1973 (TROEGER *et al.*, 2009). Alguns estudos recentes sugerem que o NoV cause apoptose em enterócitos humanos (TROEGER *et al.*, 2009), em porcos (CHEETHAM *et al.*, 2006) e em bezerros (SOUZA *et al.*, 2008). Contudo, ainda permanece um pouco obscuro se a infecção viral nos enterócitos induz a apoptose diretamente ou se um componente viral secretado por outras células induziriam a morte programada dessas células (KARST, 2010). Troeger e colaboradores postularam que o influxo intra-epitelial de linfócitos CD8⁺ durante a infecção por NoV poderia causar apoptose pela liberação de perforinas (TROEGER *et al.*, 2009).

2.5.3 Infecção Sistêmica

Embora se acredite que a infecção por NoV seja restrita ao intestino, estudos recentes detectaram o RNA viral no soro de 15% de indivíduos infectados (KARST, 2010). Além disso, estudos da infecção viral em modelos animais suportam a

disseminação do vírus através do intestino, como por exemplo, a viremia transitória detectada em 50% dos porcos gnotobióticos infectados com a cepa HS66 (CHEETHAM *et al.*, 2006), e um caso entre cinco de bezerro gnotobiótico infectado também com a cepa HS66 com RNA viral detectável no soro (SOUZA *et al.*, 2008). A possibilidade do NoV humano se disseminar para sítios periféricos apresenta relevância clínica, desde que recentes estudos têm associado a infecção pelo NoV com patologias extraintestinais, incluindo encefalopatia, coagulação intravascular disseminada e convulsões benignas infantis. O mecanismo da disseminação para tecidos periféricos do NoV é desconhecida, mas sabe-se que o NoV murino infecta células dendríticas (DC), um tipo celular conhecido por sua capacidade de migração nos tecidos através dos linfonodos. É possível que o NoV utilize a infecção em DC para facilitar a sua disseminação extraintestinal (KARST, 2010).

2.5.4 Liberação do hospedeiro

Os calicivírus humanos são liberados do trato gastrointestinal do hospedeiro através das fezes. O NoV foi também detectado no vômito através das técnicas de imunomicroscopia eletrônica (IEM) e RT-PCR (GREEN, 2007). A quantidade de vírus eliminada nas fezes é de 10³-10⁶ partículas/ml, com uma infectividade bem alta, já que a dose infecciosa mínima é de apenas 10-100 partículas virais/ml (RABENAU *et al.*, 2003). A infecção pelo NoV é tipicamente considerada como uma infecção breve, com duração de apenas poucos dias, contudo, evidências crescentes apontam para uma infecção prolongada (ou talvez persistente) em alguns cenários. Embora os sintomas causados pela infecção pelo NoV humano tenham resolução dentro de alguns dias, as partículas virais podem ser liberadas por indivíduos assintomáticos durante semanas após a exposição (KARST, 2010). Infecções assintomáticas são comuns em crianças menores que cinco anos (CASTILHO *et al.*, 2006). Alguns estudos têm demonstrado a associação entre casos assintomáticos e implicações interessantes na transmissão do vírus (SASAKI *et al.*, 2006). Em crianças menores que seis meses de idade foi relatado um tempo maior de disseminação do vírus, de até 47 dias. Esse tempo maior de liberação poderia estar associado com a imunidade imatura e/ou pela presença dos anticorpos maternos, resultando na falha dos mecanismos de estimulação do sistema imune (MURATA *et al.*, 2007). Entre os idosos, a liberação do vírus pode continuar por pelo

menos 10 dias (AOKI *et al.*, 2010), e em pacientes imunocomprometidos e aqueles que sofreram transplantes de órgãos a liberação do vírus pode ocorrer por mais de um ano (GLASS; PARASHAR; ESTES, 2009).

2.6 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Como descrito anteriormente, a infecção por NoV é considerada leve e autolimitante, embora possa ser incapacitante durante o período sintomático que normalmente tem uma duração de 24 a 48 horas (GREEN, 2007). A duração da doença pode ser maior em surtos hospitalares e entre crianças menores que 11 anos (GLASS; PARASHAR; ESTES, 2009). Os sintomas característicos são: início súbito de náuseas, vômito, dores abdominais, mialgias, diarreia, dor de cabeça, calafrios e febre (PATEL *et al.*, 2009). As fezes diarreicas são não-sanguinolentas, livres de muco e aquosas (THORNTON; JENNINGS-CONKLIN; McCORMICK, 2004). O vômito é mais prevalente em crianças com mais de um ano, enquanto que os adultos e crianças menores de um ano experimentam a diarreia (CDC, 2001, PATEL *et al.*, 2009). A febre baixa, quando presente, normalmente se resolve em 24 horas (THORNTON; JENNINGS-CONKLIN; McCORMICK, 2004; PATEL *et al.*, 2009). Sintomas no trato respiratório superior não são frequentemente relatados, entretanto, um estudo realizado em 1982, descreveu uma alta prevalência desse sintoma, sugerindo que a transmissão pela via respiratória possa ser possível em certas circunstâncias (WILSON *et al.*, 1982). A infecção por NoV em pacientes hospitalizados e com doenças crônicas é mais grave do que em pessoas imunocompetentes; assim como indivíduos com mais de 65 anos apresentam a possibilidade de uma maior duração dos sintomas (ESTES *et al.*, 2006). A infecção pelo NoV em pacientes com doenças cardiovasculares, transplante renal e terapia imunossupressiva leva à consequências mais graves, como a diminuição nos níveis de potássio, aumento nos níveis de proteína C-reativa e creatina fosfoquinase (MATTNER *et al.*, 2006). Turcios-Ruiz e colaboradores (2008) relataram a associação do NoV com enterocolite necrosante em recém-nascidos, e em 2007, Marshall e colaboradores relataram uma suposta associação do NoV com a síndrome do intestino irritável pós-infecção (PI-IBS, do inglês *postinfectious irritable bowel syndrome*) que parece ser mais transitória nos casos de gastroenterite viral do que nos casos de gastroenterite bacteriana (MARSHALL *et al.*, 2007).

2.7 IMUNIDADE E RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO

Estudos sobre a imunidade à infecção pelo NoV têm sido dificultados pela inabilidade em cultivar esses vírus em células, e desse modo, ensaios de neutralização *in vitro* não estão disponíveis (CDC, 2001). Mesmo antes da descoberta do NoV, estudos com voluntários já relatavam a transmissão de gastroenterite através da administração de filtrados fecais e o desenvolvimento de uma imunidade a curto prazo para essas infecções não-bacterianas (GORDON; IMGRAHAM; KORNS, 1947; GORDON; PATTERSON; WHITNEY, 1956). Embora os estudos sobre o NoV tenham evoluído nos últimos tempos, um completo entendimento da imunidade a esse vírus permanece vaga (MATSUI; GREENBERG, 2000; ESTES *et al.*, 2000). A susceptibilidade à infecção pelo NoV envolve a imunidade adquirida e a resistência genética (ESTES *et al.*, 2006). Sabe-se que indivíduos infectados desenvolvem uma imunidade a curto-prazo a cepas homólogas, mas os determinantes de uma imunidade a longo-prazo não foram elucidados. Os estudos em relação à imunidade à infecção por esses vírus podem ser divididos em três estágios: o primeiro estágio, “tempos antigos”, que durou de 1972 a 1978, caracterizou-se pelos estudos com voluntários humanos. O segundo estágio, “idade média”, com início em 1978 até 1990, apresentou estudos predominantemente voltados para imunoenaios realizados com o antígeno viral nativo. E por fim, o terceiro e atual estágio, “tempos modernos”, iniciado em 1990, que coincide com o desenvolvimento de antígenos recombinantes (MATSUI; GREENBERG, 2000).

Alguns estudos têm tentado determinar se os níveis pré-existentes de anticorpos no soro estão relacionados com proteção, e se uma cepa do NoV pode induzir uma proteção imunológica num segundo desafio com a mesma cepa ou com uma linhagem distinta do vírus. Ambas as imunidades, de curta duração (6-14 semanas) e de longa duração (9-15 meses), foram demonstradas por novos desafios em voluntários com agentes homólogos. Entretanto, uma imunidade de duração muito longa (27-42 meses) não foi observada para o NoV (ESTES *et al.*, 2000). Em estudos utilizando os testes sorológicos mais sensíveis, adultos com anticorpos pré-existentes não foram protegidos contra infecção tanto em estudos voluntários ou em surtos de infecção natural. Esses achados podem ser explicados porque nos adultos

de países desenvolvidos, os níveis de anticorpos no soro são provavelmente um indicativo de exposição anterior ao vírus, ao invés de uma infecção recente (MATSUI; GREENBERG, 2000). Algumas pesquisas supõem que certos indivíduos podem ser geneticamente mais susceptíveis à infecção e doença pelo NoV, o que explicaria porque aqueles indivíduos que apresentam altos níveis de anticorpos preexistentes são mais prováveis de apresentarem a doença após a exposição ao vírus (CDC, 2001). Por outro lado, embora o NoV seja altamente infeccioso, estudos com voluntários têm demonstrado que alguns indivíduos permanecem sem infecção após o desafio com altas doses. Não está claro se esses voluntários permanecem livres da doença devido a uma resistência inata ou devido a uma imunidade pré-existente ao vírus (LINDESMITH *et al.*, 2003).

2.7.1 Imunidade Inata

A imunidade inata representa um papel importante no controle da infecção do NoV murino (MNV), desde que estudos demonstraram que o fator de transcrição celular STAT-1 e os receptores para o Interferon (IFN) são críticos para a resistência a infecção com o MNV *in vivo*. Os camundongos deficientes em STAT-1 são altamente susceptíveis a infecção pelo MNV (WOBUS *et al.*, 2004). Em porcos infectados com o NoV humano, os níveis de IFN- α encontraram-se elevados após a infecção (SOUZA *et al.*, 2007). O papel da imunidade inata em controlar a infecção pode explicar porque indivíduos imunodeficientes desenvolvem uma doença mais grave e uma disseminação sistêmica do vírus após a infecção com o NoV (SCIPIONI *et al.*, 2008).

2.7.2 Imunidade Adquirida

Estudos sorológicos com voluntários revelaram que o pico da resposta de IgM ocorre por volta da segunda semana após a doença. Nos casos de um novo desafio, voluntários que estiveram previamente doentes e produziram IgM, tornaram-se doentes e apresentaram uma segunda resposta de IgM maior que a primeira. Consequentemente, a resposta de IgM ao NoV não é restrita à infecção primária (CUKOR *et al.*, 1982), mas é sim um marcador de infecção recente (BRINKER *et al.*, 1999). Em estudos com camundongos, foi observado que a administração oral de

VLPs de rNoV induziram a produção de IgG sorológica específica para o NoV e de IgA na mucosa. Como a infecção pelo NoV está localizada no intestino, a indução da imunidade local é importante para proteção contra a infecção. A imunoglobulina A é o anticorpo predominante das superfícies mucosas, produzido localmente e muito importante para a imunidade de modo geral (BALL *et al.*, 1998). Moe e colaboradores (2004) demonstraram a presença de IgA salivar específica para o NoV, assim como relatam que a soroconversão para esse vírus ocorre por volta do oitavo dia após a infecção. Tanto em camundongos como em humanos, a infecção pelo NoV gera uma resposta predominantemente, mas não exclusivamente, do tipo Th1 (BALL *et al.*, 1998, BALL *et al.*, 1999). Entretanto, a conclusão de muitos estudos em humanos é que a imunidade contra o NoV não é determinada pelos anticorpos no soro, pois anticorpos preexistentes no soro não estão associados com uma imunidade protetora (LINDESMITH *et al.*, 2003; SCIPIONI *et al.*, 2008).

2.7.3 Determinantes Genéticos da Resistência do Hospedeiro

Como citado anteriormente, vários trabalhos sugerem que o NoV reconheça os antígenos de grupos sanguíneos (HGBA) como receptores na superfície celular (HARRINGTON *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2003; HUTSON *et al.*, 2003; MARIONNEAU *et al.*, 2002) e que diferentes cepas reconhecem diferentes receptores (DAI *et al.*, 2004). A expressão desse grupo de antígenos humanos, HGBA, pode influenciar a susceptibilidade ao NoV (LINDESMITH *et al.*, 2003). O primeiro estudo sugerindo que o NoV reconheceria antígenos de grupo sanguíneo foi realizado em 2002. Os autores demonstraram que as VLPs do NoV interagem com as células Caco-2 através do reconhecimento de antígenos H tipo 1 e tipo 3, contudo, não foi verificada uma relação com essas VLPs e fenótipos de Lewis e do sistema ABO (MARIONNEAU *et al.*, 2002). Por outro lado, estudos subsequentes caracterizaram e demonstraram pelo menos quatro padrões de ligação específicos do NoV baseados nos tipos sanguíneos ABO, secretor e Lewis. O vírus prototípico Norwalk representa um dos quatro padrões de ligação e reconhece os tipos A e O secretores, mas não reconhece o tipo B secretor e não-secretor. Os outros três padrões de ligação são ligantes do tipo A, B e O secretor (cepa VA387), A e B secretor (cepa MOH), e Lewis positivo secretor e não-secretor (cepa VA207) (HUANG *et al.*, 2003). Um aumento no risco à infecção pelo NoV está associada ao

grupo sanguíneo tipo O (HUTSON *et al.*, 2003), e partículas recombinantes (VLPs) do NoV se ligam a células do epitélio de indivíduos secretores (Se+), mas não nas células de indivíduos não secretores (Se-) (MARIONNEAU *et al.*, 2002). Parece óbvio que os HBGAs sejam fatores importantes na determinação da especificidade tecidual, embora ainda permaneça obscuro se esses antígenos funcionam como um receptor primário ou se aumentam a infectividade do NoV e/ou a sua ligação a um receptor celular comum (SHIRATO *et al.*, 2008). A ocorrência natural de HBGA pode ser encontrada nos glicosfingolipídios (GSLs), que são particularmente abundantes nas células epiteliais do trato gastrointestinal. Segundo Nilsson e colaboradores (2009) esses GSLs podem representar os verdadeiros receptores para a infecção viral. Como as interações NoV/HBGA são interações típicas carboidrato/proteína, altamente diversificadas, uma mudança súbita na interface de ligação dos antígenos poderia resultar numa mudança no padrão de ligação das diferentes cepas (HUANG *et al.*, 2005). Segundo Tan e colaboradores (2003), a troca de um único aminoácido no domínio P resultaria numa mudança no padrão de ligação dos HGBA. É de se notar neste contexto, que os perfis de ligação entre os genogrupos GI e GII sejam diferentes. Tamura *et al.*, demonstraram que cepas recombinantes do genogrupo II se ligavam predominantemente a moléculas de heparan sulfato localizadas na maioria das células de mamíferos testadas, com exceção das células D-Caco-2. Por outro lado, as cepas recombinantes do genogrupo I testadas, se ligaram fracamente ou não especificamente com as moléculas de heparan sulfato. Contudo, ainda permanece obscuro se o heparan sulfato tem a função de receptor do NoV (TAMURA *et al.*, 2004).

Lindesmith e colaboradores (2003) sugerem pelo menos dois mecanismos de resistência ao NoV: (a) resistência genética inata mediada pela inativação dos alelos FUT2, e (b) a imunidade adquirida caracterizada pela rápida produção de IgA de mucosa específica para o NoV em alguns indivíduos Se+. Novos estudos devem ser realizados para melhor compreender as interações complexas entre as linhagens específicas do vírus e a susceptibilidade à infecção, e para determinar se um sítio comum de ligação a carboidratos pode ser identificado (ESTES *et al.*, 2006). Atualmente, o sítio de ligação aos carboidratos foi localizado na porção externa do domínio P da proteína do capsídeo (TAN; HEDGE; JIANG, 2004).

2.7.4 Candidatos à Vacina e Drogas Antivirais

A vacinação contra agentes microbianos é a abordagem mais efetiva para reduzir a morbi-mortalidade numa população. Os desafios para o desenvolvimento de uma vacina para o NoV são: (a) a imunidade protetora não está muito bem definida, (b) existem múltiplos tipos de NoV, (c) dados de desafios cruzados indicam que a infecção por um genótipo não protege contra uma infecção subsequente por outra cepa, (d) o vírus permanece não cultivável, e (e) não existe um modelo animal simplificado (ESTES *et al.*, 2000). Os grupos-alvo para uma vacina incluem crianças, idosos, manipuladores de alimentos, militares, viajantes, funcionários dos centros de saúde e atendentes de creches (GLASS; PARASHAR; ESTES, 2009). Estudos pré-clínicos têm demonstrado que VLPs administradas por via oral em camundongos (BALL *et al.*, 1998) e em humanos são imunogênicas e seguras, entretanto, estudos de fase II são necessários para determinar a sua viabilidade como candidatos à vacina (BALL *et al.*, 1999). A empresa farmacêutica LigoCyte vem desenvolvendo duas formulações de vacina para avaliação em estudos clínicos com humanos. A primeira é uma formulação em pó para administração intranasal e a segunda é uma formulação líquida para administração intramuscular, ambas associadas a adjuvantes. Estudos de desafios com o vírus *in natura* foram iniciados para avaliar a segurança e proteção contra os sintomas da infecção pelo NoV (LIGOCYTE, 2010).

Além dos estudos para candidatos a vacinas, as VLPs são também utilizadas para o estudo de drogas antivirais em potencial contra a gastroenterite causada pelo NoV. Acredita-se que o NoV humano se replique no intestino e que a interação com as células do hospedeiro se dê através de receptores HBGA. Uma inibição desse primeiro passo poderia ser um tratamento efetivo da doença. Feng e colaboradores elaboraram uma biblioteca de compostos com a capacidade de inibir a ligação aos receptores HBGA do NoV, utilizando antígenos salivares (FENG; JIANG, 2007). Chang e George (2007) sugerem que o IFN- γ e a Ribavirina possam ser boas opções terapêuticas para o tratamento da gastroenterite causada pelo NoV. Embora a infecção pelo NoV seja considerada autolimitante, recentes achados demonstraram que a duração pode ser mais longa em pacientes imunocomprometidos (CHANG; GEORGE, 2007). Dessa forma, o desenvolvimento de drogas antivirais pode ser de grande utilidade.

2.8 EPIDEMIOLOGIA

O NoV infecta pessoas de todas as idades (PATEL *et al.*, 2009) e causa infecção durante todo o ano, embora apresente um pico durante o inverno (ATMAR; ESTES, 2006). O padrão da sazonalidade da infecção pelo NoV é diferente nos dois hemisférios: no Hemisfério Norte os surtos são mais comuns no inverno e no início da primavera, já no Hemisfério Sul os casos ocorrem com mais frequência na primavera e no verão (MARSHALL *et al.*, 2003). Os idosos apresentam um risco maior de morte por diarreia por causa do aumento na susceptibilidade a desidratação, diminuição na imunidade e a frequente institucionalização em hospitais e asilos (LEW *et al.*, 1991), locais onde alguns casos de morte já foram relatados (LEW *et al.*, 1991; PATEL *et al.*, 2009). Embora a infecção por NoV seja classificada como branda e geralmente não necessite de hospitalização, há estudos que relatam a hospitalização de crianças, o que sugere que a infecção seja mais grave neste grupo (SOARES *et al.*, 2007).

O NoV é a principal causa de casos esporádicos (ATMAR; ESTES, 2006) e de gastroenterite epidêmica não-bacteriana ao redor do mundo (CAMPOS *et al.*, 2008; DEY *et al.*, 2007; IKE *et al.*, 2006; KAGEYAMA *et al.*, 2004; LEVETT *et al.*, 1996; LEW *et al.*, 1991; MARSHALL *et al.*, 2003; MAUNULA; VON BONSDORFF, 2005; MEDICI *et al.*, 2009; O'NEILL *et al.*, 2001; RIZZO *et al.*, 2007; SOMMER; MUELLER; RESCH, 2009; VIDAL *et al.*, 2006). Em países desenvolvidos, a soroprevalência aumenta durante os primeiros anos de vida e atinge 80-90% nos adultos jovens (ATMAR; ESTES, 2001). Estudos soropidemiológicos demonstram que as crianças adquirem anticorpos muito cedo e que a prevalência desses anticorpos continua a aumentar durante o período escolar até a idade adulta. A soroprevalência é geralmente maior em países em desenvolvimento do que nos desenvolvidos (DAI *et al.*, 2004). A facilidade de transmissão e a baixa dose de infecção resultam em surtos em diversos ambientes, incluindo hospitais, hotéis, escolas, creches, asilos para idosos e cruzeiros marítimos (BULL *et al.*, 2006; GALLIMORE *et al.*, 2004; IKE *et al.*, 2006; MARKS *et al.*, 2000). Harris e colaboradores (2010) observaram que nos surtos ocorridos em cruzeiros marítimos um número maior de pessoas foi afetado, enquanto que os surtos em centros de saúde tiveram uma duração mais longa. Além dos casos onde o NoV foi considerado a causa isolada de infecções gastrintestinais, há relatos de co-infecção com múltiplos agentes virais, como o

astrovírus e o rotavírus, ambos relacionados com infecções do trato gastrointestinal (SASAKI *et al.*, 2006).

A caracterização molecular é uma ferramenta essencial no entendimento do padrão e distribuição dos surtos causados por esse vírus (IKE *et al.*, 2006), e para determinar a possibilidade de recombinação, que é importante para propostas de diagnósticos e desenvolvimento de vacinas (VIDAL *et al.*, 2006). A análise do genoma do NoV revela uma grande diversidade dentro do gênero, mesmo em se tratando do gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que é considerada uma sequência conservada entre os genogrupos (IKE *et al.*, 2006). Tanto o genogrupo I quanto o II causam infecções em comunidades, entretanto, recentes estudos têm demonstrado a predominância das linhagens do GII (DEY *et al.*, 2007; IKE *et al.*, 2006; MARSHALL *et al.*, 2003), principalmente cepas pertencentes ao *cluster* GII.4, reconhecidamente a variante mais disseminada em todo o mundo (BULL *et al.*, 2006; KANERVA *et al.*, 2009), e que desde de 1996 tem sido amplamente divulgada como genótipo predominante. Em 2004, Lopman e colaboradores documentaram o surgimento e conseqüente predominância de uma nova cepa dentro do genogrupo II.4 (LOPMAN *et al.*, 2004). O tipo GII.4 parece ser capaz de persistir ano após ano, mesmo quando outra cepa é a predominante durante determinada estação (MAUNULA; VON BONSDORFF, 2005). Essa variabilidade genética no NoV pode proporcionar uma vantagem na sobrevivência desse patógeno (ESTES *et al.*, 2006), uma vez que no caso de células infectadas com vírus enfraquecido, a recombinação pode restaurar a sua infectividade (TEUNIS *et al.*, 2008). Contudo, não está totalmente claro se a diversidade genética se desenvolve por uma pressão da imunidade do hospedeiro ou se ocorre simplesmente porque os vírus RNA sofrem uma rápida deriva genética devido a uma polimerase propensa a erros, e pela capacidade de sofrer recombinação (ESTES *et al.*, 2006). A recombinação no NoV geralmente ocorre num ponto entre a região C-terminal da ORF1 e a N-terminal da ORF2 (BULL *et al.*, 2005), entretanto, Waters e colaboradores (2007) relataram um caso onde o sítio de recombinação estava localizado no gene da RNA polimerase, o que destaca a evolução contínua do NoV. O fato do genoma do NoV facilmente sofrer mutações que causam mudanças na antigenicidade e recombinações, resulta no surgimento de novas linhagens capazes de infectar hospedeiros susceptíveis (GLASS; PARASHAR; ESTES, 2009). A

maioria das infecções e surtos é causada por uma única cepa do vírus, mas infecções com mais de uma cepa são particularmente comuns nos casos relacionados com o consumo de moluscos ou ingestão de água contaminada (KAGEYAMA *et al.*, 2004). Essa presença simultânea de diferentes cepas num mesmo hospedeiro aumenta o risco de possíveis recombinações e no surgimento de novas linhagens (SCIPIONI *et al.*, 2008), o que pode levar ao aparecimento de novos surtos (ESTES *et al.*, 2006).

Numerosas características da infecção pelo NoV levaram a sua classificação como agentes de biodefesa Categoria B. Dentre essas características inclui-se a alta infectividade, extrema estabilidade, resistência a desinfetantes comuns e habilidade em causar doença incapacitante (KARST, 2010). O NoV é resistente a inativação com os desinfetantes de uso comum, incluindo álcool e amônio quaternário (ESTES *et al.*, 2006) e pode permanecer infeccioso por pelo menos 12 dias em superfícies contaminadas (O'NEILL *et al.*, 2001).

2.8.1 Norovírus no Brasil

O NoV é estudado no Brasil desde a década de 90, quando foi demonstrado a presença de anticorpos para o NoV nos índios da Amazônia. A diversidade genômica do NoV em crianças numa favela brasileira foi investigada em 1999 (GALLIMORE *et al.*, 2004) e em 2000, Talal e colaboradores realizaram estudos de soroprevalência e soroincidência do NoV, com uma taxa de 71% entre as crianças brasileiras (TALAL *et al.*, 2000). Segundo Gallimore e colaboradores (2004), o NoV foi identificado como agente etiológico em três de oito surtos de gastroenterite aguda que ocorreram na creche Bertha Lutz da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, no período de abril/96 a março/98. Infecções por NoV foram identificadas nas cidades de Goiânia (GO), Brasília (DF) (BORGES; CARDOSO, 2006), Salvador (BA) (CAMPOS *et al.*, 2008; XAVIER *et al.*, 2009), Recife (PE) (NAKAGOMI *et al.*, 2008) e Manaus (AM) (MIAGOSTOVICH *et al.*, 2008), nos estados de São Paulo (CASTILHO *et al.*, 2006; MORILLO *et al.*, 2008), Espírito Santo (RIBEIRO *et al.*, 2008), e no estado do Rio de Janeiro (FERREIRA *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2007; VICTORIA *et al.*, 2007). Em 2006, o grupo de pesquisa do laboratório de Virologia ICS-UFBA relatou o primeiro surto ocorrido em Salvador (BA), onde o NoV foi identificado em 62,4% das amostras coletadas no Hospital Aliança. A análise

filogenética dos dados sequenciados demonstrou que a cepa predominante era a GII.4, e que cepas do genogrupo GI não foram encontradas em nenhuma amostra (Campos, 2008). A cepa GII.4 é o genótipo predominante associado com gastroenterite por NoV ao redor do mundo, incluindo o Brasil (GALLIMORE *et al.*, 2004; CASTILLHO *et al.*, 2006; VICTORIA *et al.*, 2007).

2.9 DIAGNÓSTICO LABORATÓRIAL

Antes da introdução dos métodos de biologia molecular para diagnóstico, o diagnóstico do NoV era feito através das técnicas de microscopia eletrônica (ME), imunomicroscopia eletrônica (IME), Radioimunoensaio (RIA), ELISA ou Western Blot que detectavam a presença do antígeno viral nas fezes. Entretanto, as técnicas de microscopia eletrônica, tanto direta quanto a imunomicroscopia, requerem maior concentração viral, são demoradas e necessitam de pessoal e equipamentos especializados; além disso, o pequeno número de partículas virais encontrados nas fezes compromete a sensibilidade dos mesmos (ATMAR; ESTES, 2001).

A clonagem do genoma do NoV possibilitou o desenvolvimento de novos reagentes e métodos de diagnóstico, através do uso de VLPs para produção de anticorpos poli e monoclonais que podem ser utilizados em técnicas imunoenzimáticas, tanto para a detecção do antígeno nas fezes como para detecção de anticorpos produzidos em resposta a infecção por esses vírus (ATMAR; ESTES, 2001). Recentemente, alguns testes de ELISA comerciais foram disponibilizados, o que facilitará o diagnóstico dos surtos de gastroenterite por NoV. Contudo, a diversidade antigênica é ainda um desafio para o desenvolvimento de um protocolo para ELISA e RT-PCR que seja genérico e sensível ao mesmo tempo (DUIZER *et al.*, 2007).

2.9.1 RT-PCR

Atualmente, o RT-PCR é a técnica mais largamente utilizada para a detecção do NoV (GREEN, 2007), e considerado o padrão ouro para o diagnóstico dos surtos (DUIZER *et al.*, 2007), capaz de identificar diferentes genogrupos numa mesma amostra (ATMAR; ESTES, 2001). Na técnica de RT-PCR, iniciadores sequenciais (*primers*) são utilizados para amplificar regiões conservadas do genoma, geralmente regiões que codificam para a RNA polimerase ou VP1. Nenhum único tipo de *primer*

pode detectar todas as cepas do NoV, devido a grande diversidade na sequência de genômica, contudo, mais de 90% das cepas pode ser detectada utilizando-se dois tipos de *primers* para o genogrupo I e II. O tempo de diagnóstico pode ser reduzido utilizando-se a técnica de RT-PCR em tempo real (do inglês: *real-time* RT-PCR) (ATMAR; ESTES, 2006). Através da técnica de RT-PCR, o NoV pode ser detectado em amostras de fezes, vômito, água e alimentos contaminados ou fômites. Essa técnica tem a vantagem da alta sensibilidade e especificidade quando comparado a técnica de ELISA (ATMAR; ESTES, 2001). Contudo, apesar da alta sensibilidade, a técnica de RT-PCR sofre com a labilidade do RNA viral, a presença de inibidores nas amostras fecais (RICHARDS *et al.*, 2003), além de ser uma técnica dispendiosa e que necessita de habilidade técnica (CASTRICIANO *et al.*, 2007).

Alguns estudos têm comparado diferentes métodos de diagnóstico. Em 2003, Rabenau e colaboradores compararam os testes ELISA (Dako Citomation, Ely, UK), RT-PCR e a técnica de (imuno) microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês: *immune*) *transmission electron microscopy*). Eles estimaram uma maior sensibilidade para o RT-PCR (94,1%), seguido pelo TEM (58,3%) e ELISA (31,3%), enquanto que a especificidade foi maior para o TEM (98%), seguido do ELISA (94,9%) e RT-PCR (92,4%). Eles concluíram que os três métodos são úteis nas investigações epidemiológicas nos surtos de gastroenterite, entretanto, para maximizar a validade diagnóstica nos casos individuais, pelo menos dois desses métodos devem ser combinados (RABENAU *et al.*, 2003).

2.9.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O kit comercial IDEA™ NLV ELISA (Dako Citomation, Ely, UK), foi também testado por Richards e colaboradores (2003), e comparado com as técnicas de RT-PCR e microscopia eletrônica. O kit comercial apresentou uma sensibilidade de 55,5% e especificidade de 98,3%, quando comparado com o RT-PCR, enquanto a microscopia eletrônica apresentou sensibilidade e especificidade de 23,9% e 99,2%, respectivamente.

Outro kit comercial RIDASCREEN® Norovirus ELISA (R-biopharm AG, Darmstadt, Germany) foi testado por Gonzáles e colaboradores (2006), apresentando uma

sensibilidade e especificidade de 60% e 97,5%, respectivamente, quando comparado com a técnica de RT-PCR.

O kit RIDASCREEN® Norovirus ELISA apresenta uma mistura de anticorpos poli e monoclonais revestindo os poços das placas (fase sólida) e uma mistura semelhante conjugada a peroxidase na fase líquida, para detecção do NoV. Já o kit IDEA™ NLV ELISA apresenta apenas anticorpos monoclonais específicos para GI e GII na fase sólida e anticorpos monoclonais conjugados com peroxidase na fase líquida (CASTRICIANO *et al.*, 2007).

Dois estudos compararam os dois kits comerciais de ELISA supracitados com a técnica de RT-PCR (BRUIN *et al.*, 2006; SANZ *et al.*, 2006) e outro estudo comparou os dois ELISA com RT-PCR e ME (CASTRICIANO *et al.*, 2007). Bruin e colaboradores (2006) descreveram uma sensibilidade de 38% e 36% para os kits da IDEA™ NLV ELISA e RIDASCREEN® Norovirus ELISA, respectivamente, assim como a especificidade de 96% para o kit IDEA™ NLV ELISA e de 88% para o kit RIDASCREEN® Norovirus ELISA. Os dois kits apresentaram sensibilidade inferior ao RT-PCR. Já Sanz e colaboradores (2006) descreveram sensibilidade de 80% e especificidade de 100% para o kit IDEA™ NLV ELISA, e sensibilidade de 80% e especificidade de 90% para o kit RIDASCREEN® Norovirus ELISA. Castriciano e colaboradores (2007) utilizaram como critério de infecção o fato de a amostra ser positiva por pelo menos dois testes diferentes. Com base nesse critério, a sensibilidade e especificidade do RT-PCR foram maiores, 98,5% e 100%, respectivamente. O kit RIDASCREEN® Norovirus ELISA apresentou sensibilidade de 80,3% e especificidade de 100%, enquanto o kit IDEA™ NLV ELISA apresentou sensibilidade de 60,6% e especificidade de 100%. Os menores resultados foram obtidos através da ME, que foram sensibilidade de 36,4% e especificidade de 96,9% (CASTRICIANO *et al.*, 2007).

A detecção de anticorpos em outros fluidos biológicos, que não o soro, é um método que tem sido pouco explorado, mas que traz benefícios práticos. A saliva, por exemplo, pode ser usada como uma alternativa não invasiva para a detecção de anticorpos vírus-específicos. Moe e colaboradores (2004) desenvolveram um teste ELISA para detecção de anticorpos NoV-específicos na saliva, que apresentou uma sensibilidade de 83% e especificidade de 95-100%, quando comparado com um ELISA para detecção de anticorpos no soro.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produção de anticorpos monoclonais (AcM) para o NoV Humano, a partir de um antígeno obtido de fezes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção do antígeno de NoV, diretamente de fezes, por precipitação com Polietilenoglicol (PEG - 8000);
- Hiperimunização de camundongos com o antígeno de NoV, para produção de AcM;
- Produção e expansão de hibridomas produtores de AcM para o Norovírus Humano;
- Caracterização preliminar dos monoclonais, utilizando as técnicas de Western blot e Dot-blot;
- Utilização dos AcM para detecção do antígeno do NoV pela técnica de Dot-blot.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL

4.1.1 Amostras de Fezes

Amostras de fezes (n=21), obtidas de pacientes com gastroenterite aguda, institucionalizados no Hospital Aliança, coletadas no período de 2006 a 2009, positivas pela técnica de RT-PCR para o NoV humano, foram utilizadas para obtenção do antígeno viral. Amostras negativas (n=21) foram utilizadas como controle negativo.

As amostras de fezes (225ml), NoV positivas, foram diluídas (1:2) em PBS, homogeneizadas e centrifugadas a 12.000rpm por 30min a 4°C. O sedimento foi descartado, e o sobrenadante foi filtrado (2x) em papel de filtro (Filter Paper — Schleicher & Schuell), logo após, o filtrado foi centrifugado a 15.000rpm por 30min a 4°C, seguindo-se posteriormente, uma filtração esterilizante a 0,45µm (FILTRADO-A). Uma parte deste FILTRADO-A foi filtrada novamente em 0,22µm (FILTRADO-B). O mesmo processo foi realizado com as amostras negativas.

4.1.2 Precipitação com PEG

Na figura 6 se observa o esquema aplicado na precipitação com PEG. Os filtrados A e B foram submetidos à precipitação com PEG-8000 (8%) e NaCl (0,23%) sob agitação constante *overnight* a 4°C (FONTES *et al.*, 2005). Os filtrados A e B foram centrifugados a 10.000g por 30min a 4°C e o sedimento foi então re-suspendido com PBS. A amostra foi novamente centrifugada, a 5.000g por 20min a 4°C e o pellet foi re-suspendido com NET (Tris HCl 50mM, EDTA 1mM e NaCl 100mM) (1/100) (AMOSTRAS A1 e B1). O sobrenadante não descartado foi transferido para um tubo estéril e submetido à outra centrifugação a 5.000g por 20min a 4°C, com o objetivo de recuperar o material que não houvesse precipitado. O sobrenadante obtido dessa segunda centrifugação foi então desprezado e o pellet foi re-suspenso com NET

(AMOSTRAS A2 e B2) (ver Fig. 6). As denominações A1, A2, B1 e B2, fazem referência às primeiras e segundas centrifugações de cada filtrado para as amostras positivas. A amostra negativa só foi filtrada em filtro de 0,45µm. Em seguida, essas amostras foram fracionadas e armazenadas a -70°C.

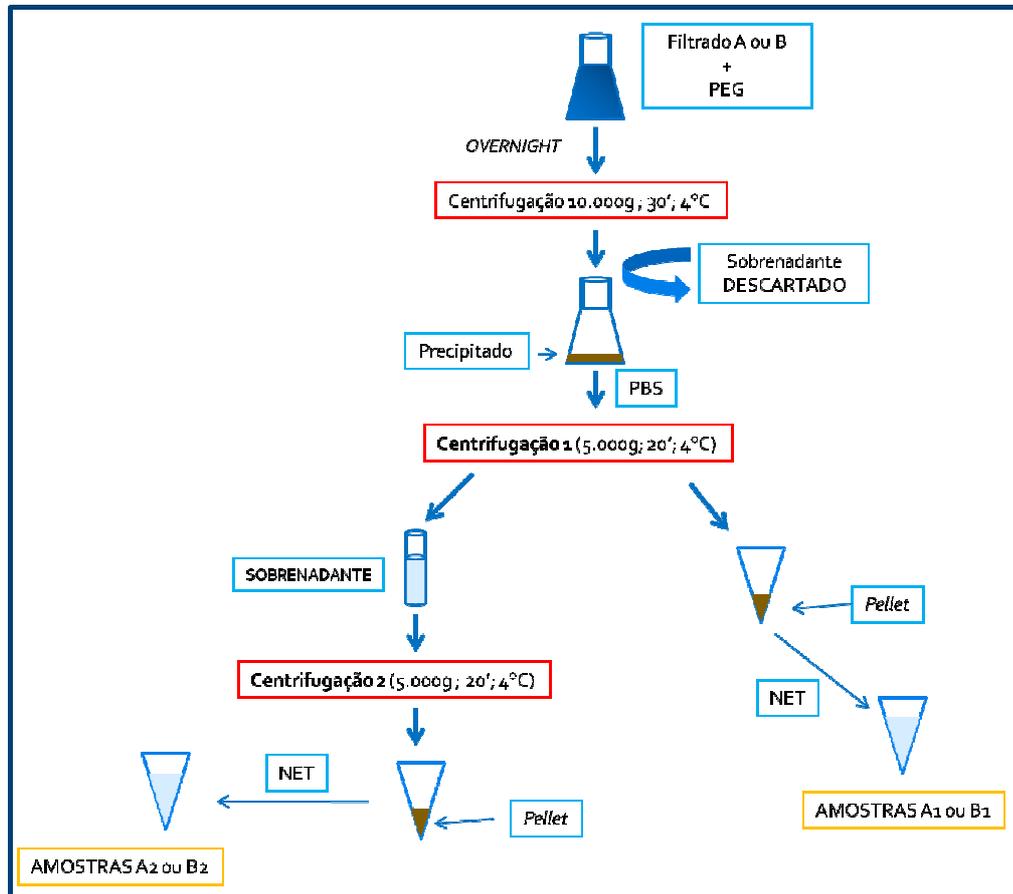


Figura 6 — Esquema da precipitação com PEG.

4.1.3 Dosagem Protéica

A concentração protéica estimada pelo método de Lowry (Kit BIOLAB) foi de 12,5µg/100µl.

4.1.4 Perfil Eletroforético do Antígeno Viral — SDS-PAGE

As amostras A1 e B1, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Inicialmente, as amostras foram diluídas em tampão desnaturante de Laemmli e levadas a 100°C durante 3 minutos em banho-maria. A corrida eletroforética das proteínas virais foi realizada a 80V. O padrão de peso molecular

(PM) utilizado foi da AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH: Fosforilase B (97KDa), Albumina Sérica Bovina (66KDa), Ovalbumina (45KDa), Anidrase Carbônica (30KDa), Inibidor da Tripsina de Soja (20,1KDa) e α -Lactalbumina (14,4KDa). Os pesos moleculares das proteínas virais foram calculados usando-se o RF (Distância em centímetros de migração da proteína a partir do gel de corrida / distância da migração do corante Commassie blue a partir do gel de corrida).

4.1.5 Análise e Identificação das Proteínas Virais

A amostra A1, submetida à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12%, apresentou duas bandas. O gel de poliacrilamida foi cortado em duas partes (FRAÇÃO-1 e FRAÇÃO-2) (Figura 7A) e ambas foram colocadas separadamente numa seringa hipodérmica (sem agulha) (figura 7B), repetindo-se o processo cinco vezes (Scheer, 2001). O material obtido foi transferido para um *ependorf*, acrescentado 400 μ l de água Milli-Q e agitado por 30seg. O tubo ficou em repouso por 5min, à temperatura ambiente, e em seguida, o material foi centrifugado a 12.000rpm por um minuto. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro *ependorf*. As frações protéicas recuperadas foram analisadas por ELISA (RIDASCREEN[®]) para detecção do antígeno em fezes.

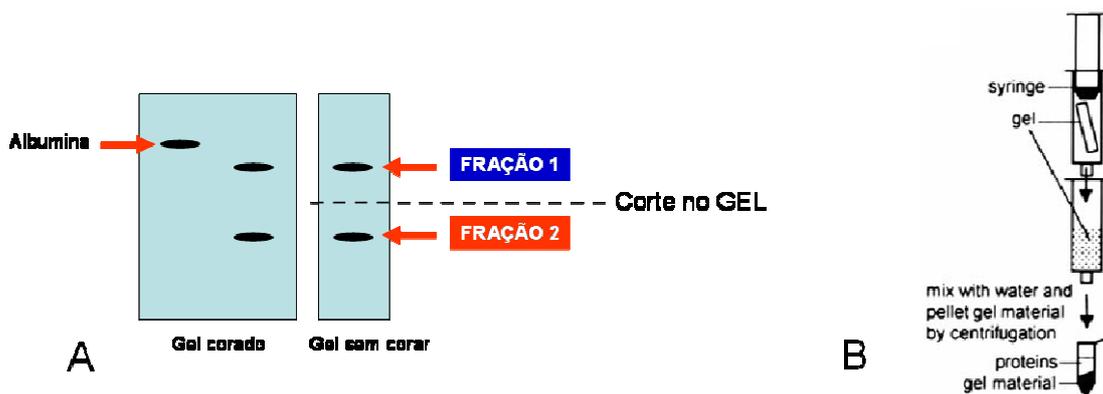


Figura 7 — Recuperação da proteína viral. A) Corte no gel para identificação e recuperação das frações protéicas de interesse. B) Recuperação de proteínas através do método SME (*Syringe Maceration Extraction*). (Scheer, 2001).

4.2 PRODUÇÃO DE AcM

4.2.1 Imunização

Camundongos BALB/c com quatro semanas de vida receberam um esquema de quatro imunizações com a amostra A1, por via intraperitoneal. Na primeira imunização, 50µg do vírus foram emulsificados com 500µl de adjuvante completo de Freund (SIGMA). As imunizações subsequentes foram realizadas com 25µg de vírus diluídos em adjuvante incompleto de Freund (SIGMA), nos dias 15, 30 e 45 após a primeira imunização. Os animais foram sacrificados quatro dias após a última imunização, e o soro hiperimune foi coletado para utilização como controle positivo nos testes de ELISA, Western Blot e Dot-blot. Da mesma forma, o soro negativo, obtido de animais não imunizados, foi utilizado como controle negativo nos testes de ELISA, Western Blot e Dot-blot.

4.2.2 Fusão Celular

Camundongos imunizados e selecionados para a fusão foram sacrificados por deslocamento cervical e submergidos em álcool iodado. O baço, removido assepticamente, foi transferido para uma placa de Petri estéril contendo solução PBS estéril, cortado em pedaços e macerado suavemente sobre um tamis para liberação das células. Em tubo estéril de 10ml, foi colocada a suspensão celular e lavada três vezes com PBS estéril, centrifugando durante 5 minutos a 10.000g. O sobrenadante foi desprezado e as células, re-suspensas em 1/10 do volume original e determinado o número e sua viabilidade, utilizando a coloração por exclusão de Azul Tripán 0,5% (GIBCO) em câmara de *Newbauer*. As células foram conservadas a 4°C até o momento de uso. As células esplênicas foram misturadas com as células de mieloma SP 2/0 em uma relação de 5:1, com Meio Iscove's Modificado, sem soro fetal bovino (SFB), e centrifugadas a 10.000g durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido, e ao sedimento foi agregado lentamente 1ml de uma solução a 37°C de PEG 4000 (SIGMA) a 50% em solução de PBS, com tubo estéril submerso em banho térmico a 37°C, homogeneizando de forma contínua durante um minuto com suaves golpes. Posteriormente, foi adicionado lentamente 20ml de

Meio Iscove's Modificado sem soro e centrifugado por 10min, a 1.000g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o novo sedimento, re-suspensão suavemente em Meio Iscove's modificado acrescido de antibiótico (Penicillin-Streptomycin — GIBCO) e 20% de SFB. As células (0,1ml/poço) foram distribuídas nas placas de cultivo (NUNC, 96 poços). A seguir, foram adicionadas células do timo de rata a uma concentração de 500.000 células por poço. Essas células, denominadas *feeders cells* ou “células alimentadoras” foram obtidas mediante remoção asséptica do órgão do animal após anestesia com Cetamina e sacrifício do mesmo. O timo foi processado como descrito anteriormente para o baço dos camundongos.

As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e 90% de umidade e, após 24 horas, foram adicionados 100µl de Meio Iscove's Modificado acrescido de glutamina, antibiótico, 20% de SFB e HAT (Hipoxantina, Aminopterina e Timidina — SIGMA), trocando-se parcialmente o meio a cada 48 horas. A visualização dos clones foi iniciada a partir do décimo dia pós-fusão. Todos os híbridos foram mantidos em Meio Iscove's Modificado com HAT durante pelo menos 15 dias. Após esse tempo, a Aminopterina foi retirada do meio de cultivo, e o Meio Iscove's Modificado, acrescido de HT, SFB (10%), antibiótico, bicarbonato e glutamina, foi utilizado por aproximadamente 30 dias, quando o componente HT foi também retirado.

4.2.3 Detecção de clones produtores de AcM: ELISA

Microplacas de poliestireno de fundo chato (NUNC) foram utilizadas como fase sólida. As placas foram sensibilizadas com aproximadamente 1µg de NoV precipitado com PEG/poço diluído (1/80) em tampão carbonato-bicarbonato (Na₂CO₃ 1,7g/l; NaHCO₃ 2,86g/l) 0,05M, pH 9,6 e incubadas por toda noite a 4°C, em câmara úmida. No dia seguinte, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 20 0,05%, bloqueadas com solução de leite em pó desnatado a 5% em PBS (PBS-leite a 5%) e incubadas durante uma hora a 37°C. Após o tempo de incubação, os sobrenadantes dos clones foram adicionados em cada poço. O soro hiperimune de camundongo e o soro negativo, diluídos em PBS-leite 0,5% (1/1000), foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Posterior à nova incubação a 4°C, *overnight*, e repetição da lavagem, foi acrescentado anticorpo anti-IgG de camundongo (SIGMA) conjugado à Peroxidase, diluído em PBS-leite a 0,5%

(1/5000). A microplaca foi incubada por mais 1,5 horas a 37°C e lavada cinco vezes com PBS-Tween 20 0,05% e uma última vez com PBS-1x. A reação foi revelada com uma solução de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, SIGMA) na presença de Peróxido de Hidrogênio e após 30 minutos, a reação foi parada com ácido hidrófluorídrico 0,125% e lida em espectrofotômetro (Microplate Reader BIO-RAD Model 550) com filtro de 630nm de comprimento de onda.

4.2.4 Clonagem dos Clones Produtores de AcM

Após a identificação dos clones produtores de anticorpos, os mesmos foram clonados baseados no método de diluição limite. Os clones com resultado positivo no ELISA de triagem (Materiais e Métodos 4.2.c) foram re-suspensos em Meio Iscove's modificado (SIGMA) acrescido com SFB 20%. Conjuntamente, foram adicionadas células do timo de rata (Materiais e Métodos 4.2.b) diluídas em Meio Iscove's modificado. A detecção, através de ELISA, dos anticorpos monoclonais clonados teve início quando os clones cobriram 40% da superfície do poço. Os clones crescidos e com resultado positivo no ELISA foram clonados novamente (reclonagem), pela mesma técnica, como forma de garantir a monoclonalidade dos anticorpos produzidos.

4.2.5 Expansão e Manutenção dos Clones Produtores de AcM

Os clones formados por células hibridomas produtoras de AcM, reclonados e com resultado positivo no ELISA de triagem foram re-suspensos de forma suave, e as células, transferidas para placas de 24 poços com Meio Iscove's modificado (SIGMA), acrescido de glutamina, antibiótico e 20% de SFB. As trocas de meio foram realizadas a cada 48 horas e ao chegar à confluência, os clones foram re-testados através do ELISA indireto. Os clones com resultado positivo no ELISA foram re-suspensos e as células levadas a placas de 06 poços (Falcon) com Meio Iscove's modificado (SIGMA), suplementado com glutamina, antibiótico e 20% de SFB. Após a confluência total das células no poço, foi realizado um teste ELISA, e aqueles poços com resultado positivo, tiveram suas células re-suspensas e amplificadas em frascos de 75cm³ (NUNC).

4.2.6 Obtenção do Líquido Ascítico

Camundongos BALB/c foram primeiramente injetados intraperitonealmente com 0,5ml de Pristane (2,6,10,14-tetrametil-pentadecano, SIGMA) para gerar uma reação inflamatória. Após sete dias, os camundongos foram injetados intraperitonealmente com $2,5 \times 10^6$ células produtoras de anticorpos monoclonais. No momento que ocorreu a distensão abdominal acentuada (geralmente após 07-10 dias), o líquido foi retirado por punção peritoneal. O líquido ascítico foi centrifugado a 1000g por 5min e o sobrenadante foi conservado, como fonte de anticorpos monoclonais, a uma temperatura de -20°C até a sua utilização.

4.2.7 Conservação das Células Hibridomas

As células hibridomas produtoras de AcM foram congeladas em nitrogênio líquido para conservação de suas propriedades. Para isso, foi desprezado o sobrenadante dos clones e as células foram re-suspensas em Meio Iscove's Modificado. Em seguida, foi adicionado volume igual do meio de congelamento, a uma concentração final de 20% de Meio Iscove's Modificado, 10% de DMSO e 20% de SFB. Os criotubos foram imediatamente levados a 4°C por 20-30 minutos. Posteriormente, as células foram transferidas para o freezer a -20°C e, após esse tempo os criotubos foram levados a -70°C por 24 horas, quando, então, foram transferidas para o nitrogênio líquido para sua conservação definitiva.

4.3 CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DOS AcM PARA O NoV

4.3.1 Reatividade contra as proteínas virais: Western blot

A reatividade dos monoclonais contra o NoV frente a polipeptídeos virais foi determinada através de Western-Blot. As amostras A1 e B1 foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%, e as proteínas eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL). Após bloqueio com PBS-leite 5% por uma hora, a membrana foi incubada, *overnight*, à temperatura ambiente, com:

- a) soro hiperimune, 1/100 em PBS-leite 0,5%;
- b) soro negativo de camundongos, 1/100 em PBS-leite 0,5%; e
- c) líquido ascítico contendo os AcM (P₃₃ e P₂₁₂), 1/10 em PBS-leite 0,5%.

No dia seguinte, a membrana foi lavada com PBS-Tween 20 0,05%, sob agitação, por 10min. A lavagem se repetiu por três vezes. Em seguida, a membrana foi incubada com IgG anti-camundongo, conjugada com Peroxidase, à 37°C por 1,5 horas. Após esse tempo, seguiram-se as lavagens com PBS-Tween 20 0,05% e uma última lavagem com PBS-1x, por 10min foi realizada. A reação foi revelada com o substrato 3'3'Diaminobenzidine (DAB) em presença de H₂O₂. O soro negativo e hiperimune serviram como controle negativo e positivo, respectivamente.

4.3.2 Detecção do antígeno viral: Dot-blot

As amostras A1, A2, B1, B2 e negativa foram diluídas em PBS-1x (1/3) e semeadas numa membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL) através do multifiltro Dot-blot. Após a semeadura, as membranas foram cortadas, bloqueadas com PBS-leite 5% durante uma hora, e em seguida, incubadas *overnight*, com:

- a) soro hiperimune de camundongos, 1/500 em PBS-leite 0,5%;
- b) soro negativo de camundongos, 1/500 em PBS-leite 0,5%; e
- c) líquido ascítico contendo os anticorpos monoclonais P₂₁₂, 1/10 em PBS-leite 0,5%.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas três vezes e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com peroxidase, diluído 1/1000 em PBS-leite 0,5%, durante 1,5 horas. Após a incubação com o conjugado, foram realizadas três lavagens com PBS-Tween 20 0,05%, por 10 minutos (cada lavagem), e uma última lavagem com PBS-1x (10min), seguindo-se a revelação com DAB em presença de H₂O₂.

4.3.3 Detecção do Antígeno Viral em Fezes Humanas: Dot-blot

PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS: Amostras fecais humanas (n=127) foram diluídas (1:2) em PBS, e centrifugadas a 3.000g, por 10min, a uma temperatura de

4°C (Figura 8). O sobrenadante foi transferido para outro tubo e mais 200µl de PBS foram utilizados para re-suspender o pellet. Após homogeneização, a suspensão foi novamente centrifugada, sob as mesmas condições e o sobrenadante transferido para o mesmo tubo que o sobrenadante anterior. O pellet foi re-suspendido mais uma vez e seguiu-se o mesmo processo de centrifugação, totalizando três centrifugações idênticas e coleta dos sobrenadantes, formando um *pool* de sobrenadantes (adaptado de SANTOS; GOUVEA, 1994).

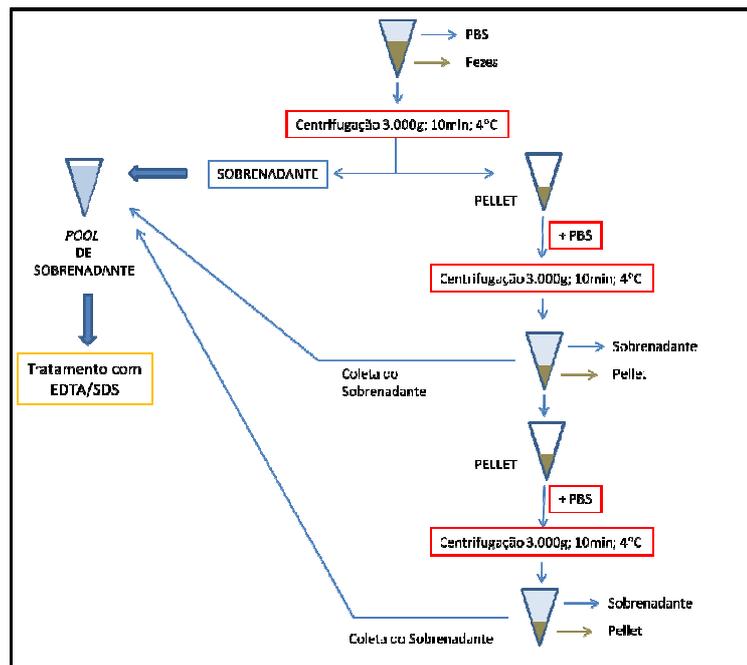


Figura 8 — Processamento das amostras fecais para o Dot-blot.

Em seguida, aos 250µl do *pool* de sobrenadantes, de cada amostra, foram acrescentados EDTA 100mM e SDS 10%. A mistura amostra/EDTA/SDS foi incubada a 56°C em banho-maria, por 20 minutos (adaptado de BELLINZONI *et al.*, 1987).

DOT-BLOT: As amostras foram semeadas numa membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL) através do multifiltro Dot-blot. Após a semeadura, as membranas foram cortadas, bloqueadas com PBS-leite 5% pelo período de uma hora, e em seguida, incubadas *overnight*, à temperatura ambiente, com:

- soro hiperimune de camundongos, 1/500 em PBS-leite 0,5%;
- soro negativo de camundongos, 1/500 em PBS-leite 0,5%; e
- líquido ascítico contendo os anticorpos monoclonais P₂12, 1/10 em PBS-leite 0,5%.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas com solução de PBS-Tween 20 0,05%. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com Peroxidase, diluído 1/1000 em PBS-leite 0,5%, durante 1,5 horas. Após esta incubação, foram realizadas três lavagens com PBS-Tween 20 0,05%, por 10 minutos (cada lavagem), e uma última lavagem com PBS (10 min), seguindo-se a revelação com DAB em presença de H_2O_2 , como mencionado anteriormente. Na figura 9, podemos observar um esquema didático desse protocolo.

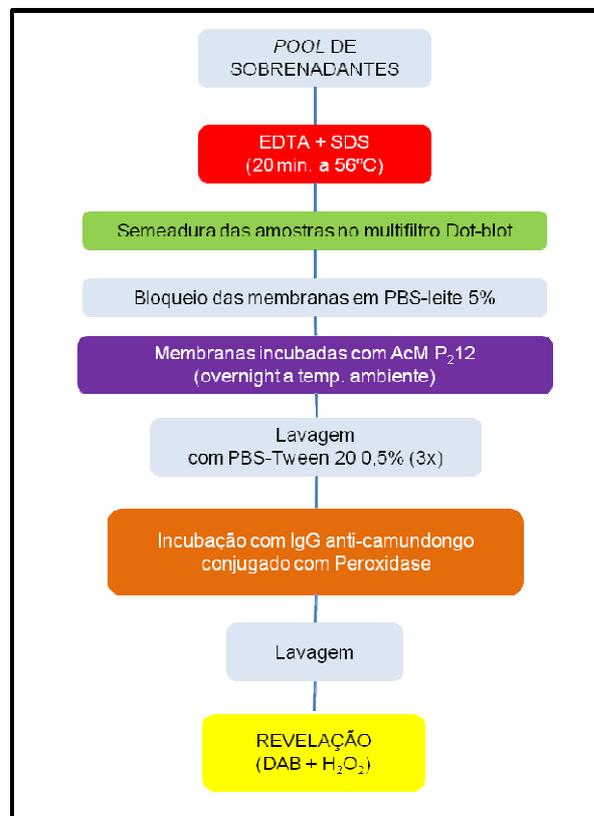


Figura 9 — Esquema utilizado para detecção do antígeno viral em fezes humanas: Dot-blot. Ao *pool* de sobrenadantes foram acrescentados EDTA e SDS seguido de incubação por 20min em banho-maria. As amostras tratadas foram semeadas numa membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL) através do multifiltro Dot-blot. Após a semeadura, as membranas foram cortadas, bloqueadas com PBS-leite 5% e em seguida, incubadas *overnight*. No dia seguinte, seguiu-se a lavagem com PBS-Tween 20 e incubação com IgG anti-camundongo conjugado com Peroxidase. Após o tempo de incubação, as membranas foram lavadas e seguiu-se a revelação com DAB na presença de H_2O_2 .

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do Dot-blot em amostras fecais foram comparadas com a técnica de RT-PCR quanto a sua sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e índice Kappa de Cohen, segundo a Tabela 1.

Índice Kappa	Concordância
< 0,00	Pobre
0,00 – 0,20	Discreto
0,21 – 0,40	Razoável
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1,00	Quase Perfeita

Tabela 1 — Interpretação do índice de Kappa de Cohen (KUNDEL; POLANSKY, 2003)

5. RESULTADOS

5.1 PEFIL ELETROFORÉTICO DO ANTÍGENO VIRAL

Após corrida eletroforética do antígeno viral num gel de poliacrilamida a 12%, foram observadas bandas de pesos moleculares de 25 a 73KDa (Figura 10). Observa-se no perfil eletroforético duas bandas fortemente coradas com *Commassie Blue*, tanto na amostras A1 quanto B1. A banda de PM 60 KDa se sugere que corresponda a proteína do capsídeo viral VP1. A outra de aproximadamente 25 KDa representaria possivelmente, produtos de degradação dessa proteína VP1.

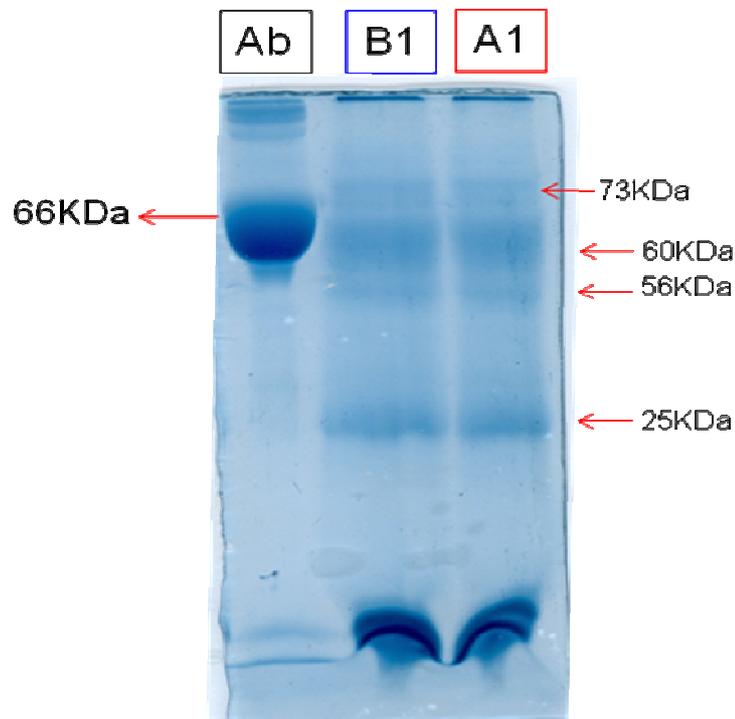


Figura 10 — **Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS (SDS-PAGE e coloração de *Commassie Blue*.** Albumina Sérica (Ab) e amostras B1 e A1. As setas indicam o peso molecular das bandas, que foram calculados usando-se o RF (distância em centímetros de migração da proteína a partir do gel de corrida / distância da migração do corante *Commassie blue* a partir do gel de corrida).

5.2 DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS VIRAIS NO PEFIL ELETROFORÉTICO

Com o objetivo de verificar a presença do antígeno viral nas FRAÇÕES 1 e 2 da amostra A1 (Figura 11), as proteínas foram recuperadas utilizando-se a técnica SEM

(Materiais e Métodos 4.1.5). O sobrenadante de cada fração da amostra A1 foi submetido ao teste ELISA RIDASCREEN® para detecção de antígeno viral em fezes. A fração protéica 1 apresentou resultado positivo para o NoV enquanto a fração protéica 2 apresentou resultado negativo. O resultado positivo no ELISA para a FRAÇÃO-1 com PM 60KDa, confirmaria a presença da proteína VP1 nesta fração. A FRAÇÃO-2, supostamente produtos de degradação da proteína VP1, provavelmente não possuiria os epítomos reconhecidos para uma reação positiva no ELISA.

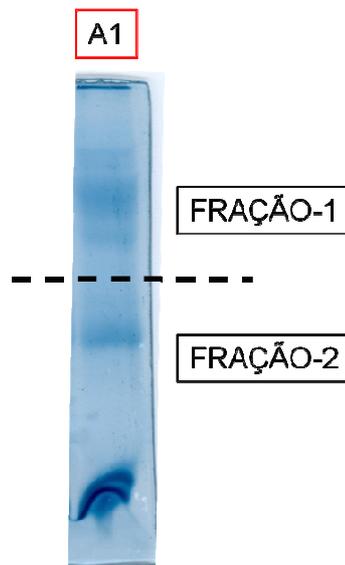


Figura 11 — Corte gel para recuperação da proteína pelo método SEM.

5.3 OBTENÇÃO DE AcM

Seis AcM foram selecionados como produtores de anticorpos para o NoV Humano através do teste ELISA de triagem (Materiais e Métodos 4.2.c) (ANEXO 1). Os AcM foram denominados P₂₆; P₃₃, P₂₁₁; P₂₁₂, P₃₁₀ e P₂₁₀. Para obtenção do líquido ascítico (Materiais e Métodos 4.2.6), foram utilizados os dois AcM que apresentaram maior reatividade no ELISA: P₃₃ e P₂₁₂.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS VIRAIS PELOS AcM — WESTERN BLOT

Na figura 12, observamos a reatividade dos AcM P₃₃ e P₂₁₂ frente as proteínas virais pelo ensaio de Western Blot. Os dois AcM reagiram com as amostras A1 e B1, apresentando um comportamento semelhante em relação a reatividade com as

proteínas virais. Podemos visualizar claramente a reatividade positiva com a banda de peso molecular próximo a 60KDa, compatível com a proteína VP1. É possível visualizar também a reatividade para outras bandas de diferentes pesos moleculares, que podem representar produtos de degradação dessa mesma proteína (VP1). Nenhum dos AcM reagiu com a amostra negativa, o que caracteriza a especificidade desses anticorpos contra o NoV humano.

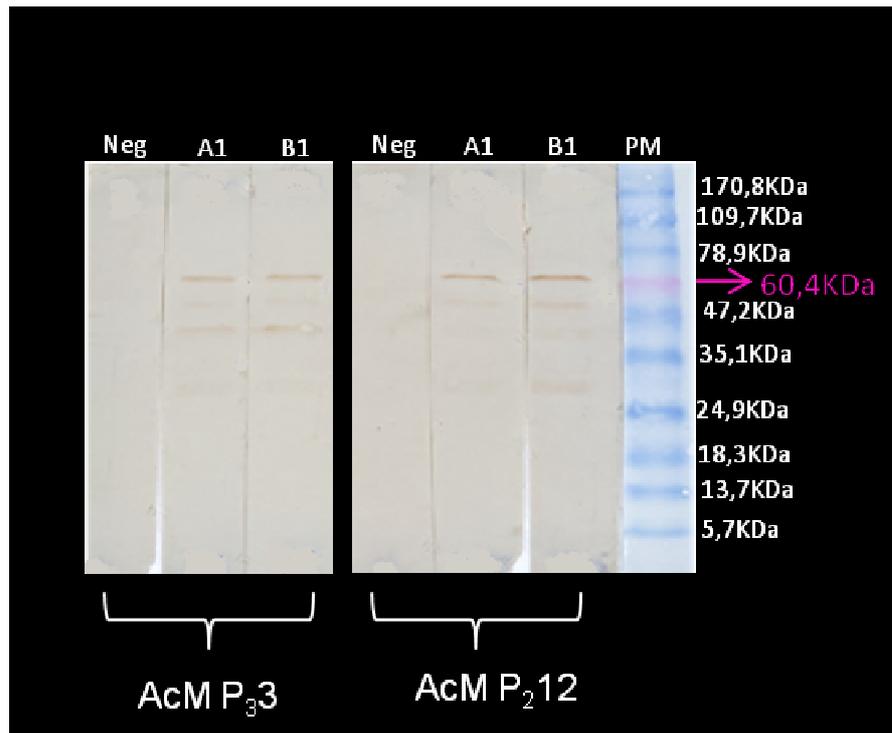


Figura 12 — **Western-blot. Reatividade dos AcM com as proteínas virais.** Reação dos AcMs P₃₃ e P₂₁₂ contra amostras (Neg), A1 e B1. PM: Marcador de peso molecular (Bench Mark Pre-Stained Protein Ladder — Invitrogen).

5.5 REATIVIDADE DOS AcM COM AS AMOSTRAS PRECIPITADAS COM PEG — DOT-BLOT

Com o intuito de detectar o antígeno viral diretamente de fezes utilizando os AcMs, verificamos inicialmente a reatividade destes AcMs com as amostras A1, A2, B1 e B2, utilizando a técnica de Dot-blot. Na figura 13 observamos a reatividade dos AcM P₃₃ e P₂₁₂ com as amostras supra citadas. O AcM P₂₁₂ apresentou melhor reatividade, com um sinal mais forte que aquele obtido pelo AcM P₃₃. Nenhum dos monoclonais reagiu com a amostra negativa. Esse experimento demonstra a viabilidade da utilização dos AcM produzidos na técnica de Dot-blot.

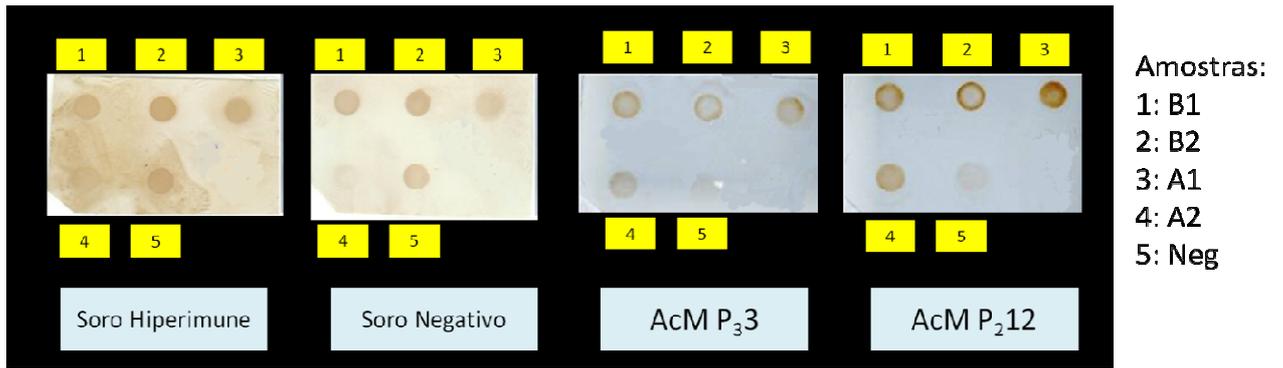


Figura 13 — Reatividade dos AcM P₃₃ e P₂₁₂ com as amostras A1, A2, B1, B2 e Neg. Os AcM P₃₃ e P₂₁₂ reagiram com as amostras positivas e não com a negativa. O Soro Hiperimune e o soro negativo foram usados com controles positivo e negativo, respectivamente.

5.6 DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL DIRETAMENTE DE FEZES PELOS AcM (DOT-BLOT)

A técnica de Dot-blot foi utilizada para detecção do antígeno viral diretamente em fezes, utilizando-se o AcM P₂₁₂. De um total de 127 amostras de fezes humanas com diagnóstico através da técnica de RT-PCR, observamos que 45/127 foram positivas e 31/127 foram negativas por ambas as técnicas (Tabela 2). O índice de concordância (Índice Kappa de Cohen) entre os testes Dot-blot e RT-PCR foi de 0,68 (Concordância Substancial). O Dot-blot, quando comparado ao RT-PCR, considerado o padrão ouro para o diagnóstico do NoV humano, apresentou uma sensibilidade de 74%, especificidade de 47%, valor preditivo positivo (VPP) de 56% e valor preditivo negativo (VPN) de 66%.

		RT-PCR		
DOT-BLOT		+	-	TOTAL
+		45	35	80
-		16	31	47
TOTAL				127

Tabela 2 — Comparação entre os resultados obtidos pela técnica do Dot-blot e a técnica de RT-PCR. 45/127 amostras foram positivas por ambas as técnicas e 31/127 amostras foram negativas por ambas as técnicas.

6. DISCUSSÃO

Um importante fator na produção de AcM é o tipo e qualidade de antígeno usado para estimular a resposta imune. No caso do NoV, a obtenção de antígeno se vê dificultada pela inexistência de uma cultura celular que suporte a replicação viral, e pela baixa concentração de partículas virais excretadas nas fezes, sendo estimado que metade do antígeno excretado esteja na forma de proteínas solúveis (HARDY *et al.*, 1995). Portanto, o maior desafio neste trabalho consistiu na obtenção de antígeno viral para viabilizar a produção dos AcM.

Alguns autores reportam a utilização da proteína VP1, obtida na forma de VLPs (do inglês: *virus-like particles*) sem RNA, como antígeno recombinante, como fonte de antígeno viral para a produção de anticorpos poli e monoclonais. (KITAMOTO *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2009; SHIOTA *et al.*, 2007; YODA *et al.*, 2001; YODA *et al.*, 2003). Poucos são os trabalhos que desenvolveram AcM com antígeno obtido diretamente de fezes (HERRMANN *et al.*, 1995; TREATOR; DOLIN; MADORE, 1988), e as técnicas reportadas, com purificação do antígeno diretamente de fezes, normalmente apresentam uma maior complexidade de execução (GREENBERG *et al.*, 1981; TREATOR; DOLIN; MADORE, 1988). Assim, o nosso objetivo foi obter este antígeno viral de uma forma menos laboriosa e com uma metodologia de simples aplicação.

Neste trabalho, a fonte do antígeno foi o vírus excretado em fezes humanas, principal via de eliminação do mesmo. A técnica de precipitação com PEG, utilizada na produção de AcM para outros vírus (FONTES *et al.*, 2005), tem demonstrado ser eficaz como agente precipitante de proteínas virais, principalmente para aumentar a concentração viral. O mecanismo exato da precipitação com PEG é pouco compreendido. É possível que ao se formarem agregados moleculares, estes sejam preferencialmente concentrados nos espaços inter-polímero das moléculas de PEG e a que a precipitação possa ocorrer com a diminuição da solubilidade (ADAMS, 1973; POLSON, 1977). O antígeno viral obtido diretamente de fezes por precipitação com PEG foi eficaz em provocar uma resposta imune em camundongos, para logo depois, pela técnica de hibridomas, obterem-se seis AcM. Entretanto, a simples precipitação com PEG não eliminaria o material contaminante, de modo que a

amostra foi submetida previamente a sucessivas filtrações esterilizantes (0,45 e 0,22 μ m).

Logo após a precipitação com PEG, a análise do perfil protéico deste antígeno viral mostrou pouca variação, o que demonstra que a última filtração de menor tamanho de poro (0,22 μ m) poderia ser desnecessária. Na análise desse perfil protéico foi evidente a presença de várias proteínas de pesos moleculares que variaram de 25 a 73KDa. Dentre elas, uma forte banda de 60KDa compatível com o peso molecular da proteína VP1. A VP1 é a principal e mais numerosa proteína que forma o capsídeo viral, sendo também responsável pela imunogenicidade do vírus (HARDY, 2005). Outro achado que fortaleceria a sugestão de que esta proteína de 60KDa seria a VP1 é o resultado positivo no ELISA RIDASCREEN[®], após recuperação dessa proteína pelo método SEM. Dentre as bandas de menor peso molecular também encontradas nesse perfil protéico, destaca-se a de 25KDa, possivelmente originada da clivagem proteolítica de VP1.

Os AcMs produzidos com este antígeno assim obtido, mostraram uma forte reatividade com a proteína de 60KDa, segundo a técnica de Western Blot. Estes AcM também mostraram reatividade com bandas de peso molecular menor. Essas bandas são possivelmente produtos de degradação da proteína VP1, já que tem sido demonstrado que esta proteína sofre clivagem proteolítica, e que o produto dessa clivagem são proteínas virais solúveis encontradas nas fezes (HARDY *et al.*, 1995). Corroborando com estes dados, alguns autores descrevem uma proteína solúvel de 32 KDa, correspondente a extremidade carboxi-terminal da VP1, encontrada em altas concentrações nas amostras fecais infectadas com o NoV (BERTOLOTTI-CIARLET *et al.*, 2002). Porém, o NoV possui também a VP2, uma proteína estrutural do capsídeo de peso molecular entre 22 e 29KDa (HARDY, 2005), o que nos levaria a hipótese de que os AcM poderiam também estar reagindo com essa proteína. Entretanto, a proteína VP2 é uma pequena proteína estrutural presente em apenas uma ou duas cópias por vírion (HARDY, 2005). Isto torna a hipótese da reação dos AcM aos produtos da clivagem proteolítica de VP1 mais provável do que o reconhecimento à proteína VP2.

Na tentativa de usar esses AcM na detecção do antígeno viral em fezes, a técnica de Dot-blot mostrou ser eficaz. As amostras de fezes sofreram um tratamento prévio

com o intuito de recuperar a maior quantidade possível do vírus presente, já que é observado que uma grande concentração do vírus é perdida no sedimento, sendo então sugerido o uso de lavagens múltiplas do *pellet*, para garantir a máxima recuperação do material viral (SANTOS; GOUVEA, 1994).

Por outro lado, para eliminar contaminantes e promover uma melhor exposição dos epítomos da proteína VP1 aos AcM, as amostras foram então tratadas com SDS, um agente surfactante que causa a desnaturação protéica, e EDTA, um forte agente quelante, usado para prevenir a degradação por enzimas (WOLLANTS *et al.*, 2004).

O ensaio Dot-blot, utilizando os AcM e com este tipo de tratamento amostral, apresentou para o diagnóstico do NoV, uma sensibilidade de 74% e especificidade de 47% quando comparado a técnica padrão ouro, RT-PCR. A sensibilidade observada no Dot-blot é semelhante, ou mesmo um pouco maior, que a de outros ensaios imunoenzimáticos comparados ao RT-PCR, que apresentaram uma sensibilidade que variava de 31,3% a 80,3% (BRUIN *et al.*, 2006; CASTRICIANO *et al.*, 2007; GONZÁLES; LIPRANDI; LUDERT, 2006; RABENAU *et al.*, 2003; RICHARDS *et al.*, 2003; SANZ *et al.*, 2006;). Por outro lado, a baixa especificidade encontrada no Dot-blot pode ser atribuída ao fato do vírus ser eliminado em baixas concentrações e que o material contaminante presente nas fezes possa dificultar o acesso dos AcM aos epítomos da proteína viral. Reforça esse conceito o fato de que, diferentemente do Dot-blot, os AcM apresentaram alta reatividade no Western Blot, onde existe uma melhor exposição dos epítomos, favorecendo a interação da reação antígeno-anticorpo.

Desta forma, este trabalho demonstrou a produção de seis AcM para o NoV, a partir de um antígeno obtido diretamente de fezes humanas, com uma metodologia de simples execução. Estes AcM apresentaram uma forte reatividade à proteína VP1 e seus produtos de degradação. Novos estudos devem ser realizados para verificar o potencial uso desses AcM para o diagnóstico do NoV.

7. CONCLUSÕES

- A técnica utilizada, de sucessivas filtrações e precipitação com PEG foi eficaz para a obtenção do antígeno viral a partir de fezes humanas.
- Este antígeno obtido diretamente de fezes apresentou um perfil protéico compatível com o NoV.
- O antígeno também foi eficaz na produção de uma resposta imune que possibilitou a obtenção dos AcM.
- Os AcM obtidos apresentaram uma forte reatividade para a proteína viral VP1.
- Os AcM poderiam ser úteis nos estudos futuros desta proteína viral (VP1) ou na detecção do vírus nas fezes.

REFERÊNCIAS

ADAMS, A. **Concentration of Epstein-Barr virus from cell culture fluids with polyethylene glycol.** J Gen Virol, 1973, v.20, p.391-394.

AGUS, S.G. *et al.* **Acute infectious nonbacterial gastroenteritis intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations.** Annals of Internal Medicine, 1973, v. 79, p. 18-25.

ANDO, T.; Noel, J.S.; Frankhauser, R.L. **Genetic classification of “Norwalk-like viruses”.** J Infect Dis, 2000, v.181, p.336-348.

AOKI, Y. *et al.* **Duration of norovirus excretion and longitudinal course of viral load in norovirus-infected elderly patients.** Journal of Hospital Infection, 2010, v.75, p.42-46.

ASANAKA, M. *et al.* **Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells.** PNAS, 2005, v. 102, n. 29, p. 10327-10332.

ATMAR, R.L.; Estes, M.K. **Diagnosis of Noncultivable Gastroenteritis Viruses, the Human Caliciviruses.** Clinical Microbiology Reviews, 2001, v. 14, n.1, p. 15-37.

_____. **The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection.** Gastroenterol Clin, 2006. v. 35, p. 275-290.

BALL, J.M. *et al.* **Oral Immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in Mice.** J Virol, 1998, v.72, n. 2, p. 1345-1353.

_____. *et al.* **Recombinant Norwalk virus-like Particles given orally to volunteers: Phase I study.** Gastroenterology, 1999, 117:40-48.

BELLINZONI, R.C. *et al.* **Isolation of group A swine rotaviruses displaying atypical electropherotypes.** J Clin Microbiology, 1987, v. 25 p. 952-954.

BERG, D.E. *et al.* **Multi-state outbreaks of acute gastroenteritis traced to fecal-contaminated oysters harvested in Louisiana.** J Infect Dis, 2000, v.181, p. 381-386.

BERTOLOTI-CIARLET, A. *et al.* **Structural Requirements for the Assembly of Norwalk Virus-like particles.** Journal of Virology, 2002. v. 76, n. 8, p. 4044-4055.

_____. *et al.* **The 3' End of Norwalk Virus mRNA Contains Determinants that Regulate the Expression and Stability of the Viral Capsid Protein VP1: a Novel Function for the VP2 Protein.** Journal of Virology, 2003, v. 77, n.21, p. 11603-11615.

BORGES, A.M.T.; Cardoso, D.D.P. **Calicivírus Humanos**. Revista de Patologia Tropical, 2005, v.34, p.17-26.

_____. *et al.* **Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil**. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006, v. 101,p.721-724.

BRINKER, J.P. *et al.* **Immunoglobulin M antibody test to detect genogroup II Norwalk-like virus infection**. J Clin Microbiol, 1999, v. 37, p. 2983-2986.

BRUIN, E. *et al.* **Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR**. J Virol Methods, 2006, v.137, p.259-264.

BULL, R.A. *et al.* **Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap**. Emerg Infect Dis, 2005, v.11, p.1079-1085.

_____. *et al.* **Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis**. J Clin Microbiol, 2006, v.44, n.2, p.327–333.

BURROUGHS, J.N. and Brown, F. **Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA**. J. Gen. Virol., 1978, v.41, p.443-446.

CAMPOS, G.S. *et al.* **Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized Young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil**. Arch Virol, 2008, v.153, n.6, p.1125-1129.

CASTILHO, J.G. *et al.* **Genetic diversity of Norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo State, Brazil**. J Clin Microbiol, 2006, v. 44, n.11, p.3947-3953.

CASTRICIANO, S. *et al.* **Comparison of the RIDASCREEN® norovirus enzyme immunoassay to IDEA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy**. J Virol Methods, 2007, v.141, p.216-219.

CAUL, E.O. **Small round structure viruses: airbourne transmission and hospital control**. Lancet 1994, v.343, p.1240-1242.

CDC Morbidity and Mortality Weekly Report. **“Norwalk-Like Viruses” Public Health Consequences and Outbreak Management**, v.50, n. RR-9. Atlanta, Georgia, 2001.

CHANG, K.O. **Role of Cholesterol Pathways in Norovirus Replication**. Journal of Virology, 2009, v.83, n.17, p.8587-8595.

_____. and George, D.W. **Interferons and ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replication-bearing cells**. Journal of Virology, 2007, v.81, p.12111-12118.

CHEETHAM, S. *et al.* **Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs**. J Virol, 2006, v.80, p.10372-10381.

CHRIS, A. **Norwalk-like viruses: when the runs can slow you down.** JAMC Public Health, 2003, v.168, p.64-65.

CLARKE, I.N. and Lambden, P.R. **The molecular biology of caliciviruses.** Journal of General Virology, 1997, v.78, p.291-301.

CUKOR, G. *et al.* **Immunoglobulin M responses to the Norwalk virus of gastroenteritis.** Infect Immun, 1982, v.37, p.463-468.

DAI, Y. *et al.* **Seroprevalence of antibodies against Noroviruses among students in Chinese Military Medical University.** Journal of Clinical Microbiology, 2004, v.42, n.10, p.4615-4619.

DEY, S.K. *et al.* **Molecular and epidemiological trend of norovirus associated gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh.** Journal of Clinical Virology, 2007, v.40, p.218-223.

DUIZER, E. *et al.* **Laboratory efforts to cultivate Noroviruses.** J Gen Virol 2004; v.85, p.79-87.

_____. *et al.* **Probabilities in norovirus outbreak diagnosis.** J clin Virol, 2007, v.40, p.38-42.

ESTES, M.K. *et al.* **Norwalk virus vaccines: challenges and progress.** 2000. J Infect Dis, v.181, n.2, p.S367-S373.

_____. *et al.* **Noroviruses everywhere: has something changed?** Curr Opin Infect Dis, 2006, v.19, p.467-474.

ETTAYEBI, K. and Hardy, M.E. **Norwalk Virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of Vesicular Stomatitis Virus G Protein.** Journal of Virology, 2003, v.77, n.21, p.11790-11797.

FENG, X. and Jiang, X. **Library Screen for inhibitors targeting Norovirus binding to histo-blood group antigen receptors.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, v.51, n.1, p.324-331.

FERNÁNDEZ, J.M.R. y Gómez, J.B. **Infecciones por norovirus.** Emferm Infecc Microbiol Clin, 2010, v.28, n.1, p.51-55.

FERNANDEZ-VEGA, V. *et al.* **Norwalk Virus N-terminal Nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi Complex in transfected cells.** Journal of Virology, 2004, v.78, n.9, p.4827-4837.

FERREIRA, M.S.R. *et al.* **Acute Gastroenteritis cases associated with Noroviruses infection in the State of Rio de Janeiro.** J Med Virol, 2008, v.80, p.338-344.

FONTES, L.V.Q. *et al.* **Precipitation of bovine rotavirus by polyethylen glycol (PEG) and its application to produce polyclonal and monoclonal antibodies.** Journal of Virological Methods, 2005, v.123, p.147-153.

GLASS, P.J. *et al.* **Norwalk virus Open Reading Frame 3 encodes a minor structural protein.** Journal of Virology. 2000a; v.74, n.14, p.6581-6591.

GLASS, R.I. *et al.* **The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostic.** J Infect Dis 2000b; v.181, p.S254-261.

_____.; Parashar, U.D.; Estes, M.K. **Norovirus Gastroenteritis.** N Engl J Med, 2009, v.361, p.1776-1785.

GALLIMORE, C.I. *et al.* **Noroviruses associated with acute gastroenteritis in children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2004, v.37, p.321-326.

GONZÁLES, 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, 2006, 136:289-291.

GORDON, I.; Imgraham, H.S., Korn, R.F. **Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates.** J Exp Med, 1947, v.86, p.409-422.

_____.; Patterson, P.R.; Whitney, E. **Immunity in volunteers recovered from nonbacterial gastroenteritis.** J Clin Invest, 1956, v.35, p.200-205.

GREEN, K.Y. *et al.* **Taxonomy of the caliciviruses.** Journal of Infectious Diseases, 2000, v.181, n.2, p.S322-S330.

_____. **Caliciviridae: The Noroviruses.** In Knipe DM, Howley PM, Fields Virology, ed.5, 2007. Lippincott Williams & Wilkins, v.1, p.949-971.

GREENBERG, H.B. *et al.* **Proteins of Norwalk Virus.** Journal of Virology, 1981, v.37, n.3, p.994-999.

GUIX, S. *et al.* **Norwalk Virus RNA is infectious in mammalian cells.** Journal of Virology, 2007, v.81, n.22, p.12238-12248.

HARDY, M. E. *et al.* **Specific Proteolytic Cleavage of Recombinant Norwalk Virus Capsid Protein.** Journal of Virology, 1995, v.69, n.3, p.1693-1698.

HARDY, M.E. **Norovirus protein structure and function.** FEMS Microbiology Letters, Bozeman, Montana, USA, 2005. v.253, n.1, p.1-8.

HARRINGTON, P.R. *et al.* **Binding of Norwalk virus-like particles to ABH Histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice.** *Journal of Virology*, 2002, v.76, n.23, p.12335-12343.

HARRIS, J.P.; Lopman, B.A.; O'Brien, S.J. **Infection control measures for norovirus: a systematic review of outbreaks in semi-enclosed settings.** *J Hospital Infections*, 2010, v.74, p.1-9.

HERRMANN, J.E. *et al.* **Monoclonal Antibodies for detection of Norwalk Virus in Antigen in Stools.** *J Clin Microbiol*, 1995, v.33, n.9, p.2511-2513.

HUANG, P.T. *et al.* **Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns.** *J Infect. Dis.*, 2003, v.188, p.19-31.

_____. *et al.* **Norovirus and Histo-blood Group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns.** *Journal of Virology*, 2005, v.79, n.11, p.6714-6722.

HUTSON, A.M. *et al.* **Norwalk Virus-like particle hemagglutination by binding to H Histo-blood group antigens.** *Journal of Virology*, 2003, v.77, p.405-415.

IKE, A.C. *et al.* **Molecular Epidemiology of Norovirus in Outbreaks of Gastroenteritis in Southwest Germany from 2001 to 2004.** *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, v.44, n.4, p.1262-1267.

JIANG, X. *et al.* **Norwalk virus genome: cloning and characterization.** *Science* 1990, v.250, p.1580-1583.

_____. *et al.* **Expression, self-assembly and antigenicity of the Norwalk Virus capsid protein.** 1992. *Journal of Virology*, v.66, n.11, p.6527-6532.

_____. *et al.* **Sequence and genome organization of Norwalk virus.** *Virology* 1993, v.195, p.51-61.

KAGEYAMA, T. *et al.* **Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to *Norovirus* in Japan.** *J Clin Microbiol*, 2004, v.40, p.794-798.

KANERVA, M. *et al.* **Prolonged norovirus outbreak in a Finnish tertiary care hospital caused by GII.4-2006b subvariants.** *Journal of Hospital Infection*, 2009, v.71, p.206-213.

KAPIKIAN, A.Z. *et al.* **Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis.** J Virol, 1972, v.10, p.1075-1081.

_____. **The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective.** J Infect Dis, 2000; 181:S295-302.

KAPLAN, J.E. *et al.* **The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis.** Am J Public Health, 1982, v.72, n.12, p.1329-32.

KARST, S.M. **Pathogenesis of Noroviruses, emerging RNA viruses.** Viruses, 2010,v.2, p.748-781.

KATAYAMA, K. *et al.* **Investigation of norovirus replication in human cell line.** Arch Virol, 2006, v.151, p.1291-1308.

KITAMOTO, N. *et al.* **Cross-reactivity among several recombinant Calicivirus Virus-like Particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP.** Journal of Clinical Microbiology, 2002, v.40, n.7, p.2459-2465.

KÖHLER, G.; Milstein, C. **Continuous cultures of cells secreting antibody of defined specificity.** Nature, 1975, v.256, p. 495-497.

KUNDEL, H. L.; Polansky, M. **Measurement of Observed Agreement.** Radiology, 2003, v.228, p.303-308.

LADYMAN, H.M. and Ritter, M.A. **Production of monoclonal antibodies.** In: Ritter, M.A. and Ladyman, H.M. Monoclonal antibodies production, engineering and clinical application. Cambridge University Press, 1995, p. 9-33.

LEVETT, P.N. *et al.* **Longitudinal study of molecular epidemiology of small round-structured viruses in a pediatric population.** J Clin Microbiol, 1996, v.43, p.1497-1501.

LEW, J.F. *et al.* **Diarrheal Deaths in the United States, 1979 through 1987.** JAMA, 1991, v.265, n.24, p.3280-3284.

LI, X. *et al.* **Identification and characterization of a native epitope common to norovirus strains GII/4, GII/7 and GII/8.** Virus Res, 2009, v.140, p. 188-193.

LIGOCYTE Pharmaceuticals Inc. **Norovirus Vaccine.** Disponível em: <<http://www.ligocyte.com/downloads/Noro.pdf> > Acesso em 25 de maio de 2010.

LINDESMITH L.C *et al.* **Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection.** Nature Medicine, 2003, v.9, p.548-553.

_____. *et al.* **Mechanisms of GII.4 Norovirus persistence in human populations.** PLoS Medicine, 2008, v.5, p.269-290.

- LOPMAN, B. *et al.* **Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant.** The Lancet, 2004, v.363, p.682-688.
- MALIK, Y.S. *et al.* **Evaluation of animal Origin cell cultures for in vitro cultivation of noroviruses.** Intern J Appl Res Vet Med, 2005, v.3, p.217-222.
- MARIONNEAU, S. *et al.* **Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals.** Gastroenterology, 2002, v.122, p.1967-1977.
- MARKS P.J. *et al.* **Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NVL) in a hotel restaurant.** Epidemiol Infekt, 2000, v.124, p.481-487.
- MARSHALL, I.A. *et al.* **Incidence and characteristics of endemic Norwalk-like virus - associated gastroenteritis.** J Med Virol, 2003, v.69, p.568-578.
- MARSHALL, J.K. *et al.* **Postinfectious irritable bowel syndrome after a food-borne outbreak of acute gastroenteritis attributed to a viral pathogen.** Clin Gastroenterol Hepatol, 2007, v.5, p.457-460.
- MATTNER, F. *et al.* **Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation.** Clin Microbiol Infection, 2006, v.12, p.69-76.
- MATSUI, S.M.; Greenberg, H.B. **Immunity to Calicivirus infection.** J Infect Dis, 2000, v.181, n. 2, p.S331-335.
- MAUNULA, L.; Von Bonsdorff, C.-H. **Norovirus genotypes causing gastroenteritis outbreaks in Finland 1998-2002.** Journal of Clinical Virology, 2005, v.34, n.3, p.186-194.
- MEDICI, M.C. *et al.* **An outbreak of norovirus infection in an Italian residential-care facility for the elderly.** Clin Microbiol Infect, 2009, v.15, p.97-100.
- MIAGOSTOVICH, M.P. *et al.* **Molecular detection and characterization of gastroenteritis virus occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil.** Applied and Environmental Microbiology, 2008, v.74, n.2, p.375-82.
- MOE, C.L. *et al.* **Diagnosis of Norwalk virus infection by Indirect Enzyme Immunoassay detection of salivary antibodies to recombinant Norwalk virus antigen.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2004, v.11, n.6, p.1028-1034.
- MORILLO, S.G. *et al.* **Identification and molecular characterization of norovirus in São Paulo State, Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology, 2008, v.39, p.619-622.
- MURATA, T. *et al.* **Prolonged shedding in infants \leq 6 months of age with gastroenteritis.** The Pediatric Infect Dis Journal, 2007, v.26, p.46-49.

NAKAGOMI, T. *et al.* **Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis.** Arch Virol, 2008, v.153, p.957-960.

NILSSON, J. *et al.* **Norwalk virus-like particles bind specifically to A, H and difucosylated Lewis but not to B histo-blood group active glycosphingolipids.** Glycoconjugate Journal, 2009, v.26, p.1171-1180.

OLIVER, S.L. *et al.* **Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae.** Virology, 2006, v.350, p.240-250.

O'NEILL, H.J. *et al.* **Gastroenteritis outbreaks associated with Norwalk-like viruses and their investigation by nested RT-PCR.** BMC Microbiology, 2001, p.1-14.

PATEL, M.M. *et al.* **Noroviruses: A comprehensive review.** Journal of clinical Virology, 2009, n.44, p.1-8.

POLSON, A. **A theory for the displacement of proteins and viruses with polyethylene glycol.** Prep Biochem and Biotechnology, 1977, v.7, p.129-154.

PRASAD, B.V.V. *et al.* **X-ray crystallographic structure of Norwalk virus capsid.** Science, 1999, v.286, p.287-290.

_____.; Hardy, M.E.; Estes, M.K. **Structural studies of recombinant Norwalk capsids.** J Infect Dis, 2000, n.181, p.317-321.

RABENAU, H.F. *et al.* **Laboratory diagnosis of Norovirus: which method is the best?** Intervirology, 2003, v.46, p.232-238.

RIBEIRO, L.R. *et al.* **Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008, v.103, p.201-206.

RICHARDS A.F. *et al.* **Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces.** Journal of Clinical Virology, 2003, v.26, p.109-115.

RIZZO, C. *et al.* **Epidemiological and virological investigation of a Norovirus outbreak in a resort in Puglia, Italy.** BMC Infectious Diseases, 2007, p.1-7.

RONVEAUX, O. *et al.* **An outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis in a nursing home in Rotterdam.** Eurosurveillance, 2000, v.5, p.54-57.

SANTOS, N. and Gouvea, V. **Improved method for purification of viral RNA from fecal specimens for rotavirus detection.** J Virol Methods, 1994, v.46, p.11-21.

SANZ, J.C. *et al.* **Evaluación de dos métodos de detección antigênica por ELISA para El diagnóstico de brotes causados por norovirus.** Enferm Infecc Microbiol Clin, 2006, v.24, p.564-567.

SASAKI, Y. *et al.* **Multiple viral infection and genomic divergence among Noroviruses during an Outbreak of acute gastroenteritis.** Journal of Clinical Microbiology, 2006, v.44, n.3, p.790-97.

SCHEER, J.M.; Ryan, C.A. **A method for the quantitative recovery of proteins from polyacrylamide gels.** Anal Biochem, 2001, v.298, p.130-132.

SCIPIONI, A. *et al.* **Animal Noroviruses.** The Veterinary Journal, 2008, v.178, p.32-45.

SHIOTA, T. *et al.* **Characterization of a broadly reactive monoclonal antibody against norovirus genogroups I e II: recognition of a novel conformational epitope.** J Virol, 2007, v.81, p.12298-12306.

SHIRATO, H. *et al.* **Norovirus distinguish between Type 1 and Type 2 Histo-blood Group antigens for binding.** Journal of Virology, 2008, v.82, n.21, p.10756-10767.

SOARES, C.C. *et al.* **Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil.** Emerg Infet Dis, 2007, v.13, n.8, p.1244-46.

SOMMER, C.; Mueller, W.; Resch, B. **Two nosocomial norovirus outbreaks in the neonatal intensive and intermediate care unit.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, v.28, p.1133-1136.

SOUZA, M. *et al.* **Cytokine and antibody responses in Gnotobiotic pigs after infection with norovirus genogroup II.4 (HS66 Strain).** Journal of Virology, 2007, v.81, n.17, p.9183-9192.

_____. *et al.* **Pathogenesis and Immune responses in Gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4 – HS66 strain of human norovirus.** J Virol, 2008, v.82, n.4, p.1777-1786.

TALAL, A.H. *et al.* **Seroprevalence and seroincidence of Norwalk-like virus infection among Brazilian infants and children.** J Med Virol, 2000, v.61, p.117-24.

TAMURA, M. *et al.* **Genogroup II Noroviruses efficiently bind to heparin sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane.** J Virol, 2004, v.78, n.8, p.3817-3826.

TAN, M. *et al.* **Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket.** J Virol, 2003, v.77, p.12562-12571.

_____.; Hegde, R.S. and Jiang, X. **The P domain of Norovirus capsid protein forms dimer and binds to Histo-blood group antigens receptors.** Journal of Virology, 2004, v.78, n.12, p.6233-6242.

TAUBE, S.; Kurth, A. and Schreier, E. **Generation of recombinant Norovirus-like particles (VLP) in the human endothelial kidney cell line 293T.** Arch Virol, 2005, v.150, p.1425-1431.

TEUNIS, P.F.M. *et al.* **Norwalk Virus: How infectious is it?** Journal of Medical Virology, 2008, v.80, p.1468-1476.

THORTON, A.C., Jennings-Conklin, K.S. McCormick, M.I. **Noroviruses: Agents in Outbreaks of Acute Gastroenteritis.** Disaster Management & Response, 2004, v.2, n.1, p.4-9.

TREANOR, J. Dolin, R. and Madore, H.P. **Production of monoclonal antibody against the Snow Mountain agent of gastroenteritis by in vitro immunization of murine spleen cells.** Proc Natl Acad Sci, 1988, v.85, p. 3613-3617.

TROEGER, H. *et al.* **Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection.** Gut, 2009; v.58, n.8, p.1070-1077.

TURCIOS-RUIZ, R.M. *et al.* **Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit.** J Pediatr, 2008, v.153, p.339-44.

VICTORIA, M. *et al.* **Prevalence and Molecular Epidemiology of Noroviruses in Hospitalized children with Acute Gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004.** The Pediatric Inf Dis Journal, 2007, v.26, n.7, p.602-606.

VIDAL, R. *et al.* **Novel Recombinant Norovirus causing outbreaks of gastroenteritis in Santiago, Chile.** J Clin Microbiol, 2006, v.44, n.6, p.2271-2275.

WATERS, A.; Coughlan, S.; Hall, W.W. **Characterization of a novel recombination event in the norovirus polymerase gene.** Virology, 2007, 363, p. 11-14.

WILSON, R. *et al.* **Waterborne gastroenteritis due to the Norwalk agent clinical and epidemiological investigation.** Am J Public Health, 1982, v.72, n.1, p.72-74.

WHITE, L.J. *et al.* **Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines.** Journal of Virology, 1996, v.70, n.10, p.6589-6597.

WOBUS, C.E. *et al.* **Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages.** PLoS. Biol., 2004, v.2,n.12, e432.

_____, Thackray, L.B., Virgin IV, H.W. **Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis.** J. Virol., 2006, v.80, n.11, p.5104-5112.

WOLLANTS, E. *et al.* **Evaluation of a norovirus sampling method using sodium dodecyl sulfate/EDTA-pretreated chromatography paper strips.** Journal of Virological Methods, 2004, v.122, p.45-48.

YODA, T. *et al.* **Characterization of Norwalk virus GI specific monoclonal antibodies generated against Escherichia coli expressed capsid protein and the reactivity of two broadly reactive monoclonal antibodies generated against GII capsid towards GI recombinant fragments.** BMC Microbiol, 2001, v.1, p.24.

_____. *et al.* **Precise characterization of Norovirus (Norwalk-like virus)-Specific Monoclonal Antibodies with broad reactivity.** Journal of Clinical Microbiology, 2003, v. 41, n.6, p. 2367-2371.

XAVIER, M.P.T.P. *et al.* **Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil.** Brazilian Journal of Med and Biol Res, 2009, v.42, p.438:444.

ZHENG, D.P. *et al.* **Norovirus classification and proposed strain nomenclature.** Virology, 2006, v.346, p.312-323.

ANEXO 1

Leitura do ELISA de Triagem

Poço	AcM	Leitura Elisa (30')
5A	A4P1	0.095
5B	C9P1	0.097
5C	E3P1	0.095
5D	E5P1	0.092
5E	E8P1	0.091
5F	P ₂ 11	0.101
5G	H1P1	0.097
5H	A6P2	0.085
6A	P ₂ 12	0.122
6B	A11P2	0.087
6C	B4P2	0.086
6D	B6P2	0.091
6E	C11P2	0.090
6F	D8P2	0.093
6G	D12P2	0.095
6H	E2P2	0.092
7A	P ₂ 10	0.102
7B	F9P2	0.084
7C	F10P2	0.084
7D	SH+	0.499
7E	H5P2	0.085
7F	P ₃ 3	0.114

Poço	AcM	Leitura Elisa (30')
7G	P ₂ 6	0.111
7H	P ₃ 10	0.105
8A	D1P3	0.098
8B	D10P3	0.098
8C	E5P3	0.088
8D	E4P3	0.096
8E	F5P3	0.087
8F	H4P3	0.091
8G	24A1	0.095
8H	24B1	0.097
9A	24C1	0.087
9B	24A2	0.090
9C	SH-	0.090
9D	24B2	0.085
9E	24C2	0.079
9F	24D2	0.087
9G	24A3	0.091
9H	24B3	0.098
10A	24C3	0.093
10B	24D3	0.095
10C	24A4	0.082
10D	24B4	0.085

Poço	AcM	Leitura Elisa (30')
10E	24C4	0.080
10F	24D4	0.089
10G	24 ^a 5	0.090
10H	24C5	0.091
11A	PBS-leite	0.092
11B	PBS-leite	0.073
11C	B6P2	0.084
11D	C7P3	0.085
11E	24D6	0.080
11F	24C6	0.089
11G	24A6	0.091
11H	24D5	0.054
12A	SH+	0.214
12B	SH-	0.104
12C	F5P3	0.088
12D	D1P3	0.080
12E	SH+	0.451
12F	SH+	0.084
12G	H6P2	0.096
12H	D10P3	0.66