



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**IDENTIFICAÇÃO, DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DO NOROVÍRUS HUMANO EM PACIENTES
COM GASTROENTERITE AGUDA**

Fabiana Lopes de Paula

Salvador – BA

2014

FABIANA LOPES DE PAULA

**IDENTIFICAÇÃO, DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DO NOROVÍRUS HUMANO EM PACIENTES COM
GASTROENTERITE AGUDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Gúbio Soares Campos

Co-orientadora: Sílvia Inês Sardi

Salvador – Bahia

2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde do SIBI /UFBA

P324 Paula, Fabiana Lopes de

Identificação, diagnóstico e caracterização molecular do norovírus humano em pacientes com gastroenterite aguda / Fabiana Lopes de Paula . – Salvador, 2014.

128 f. : il.

Orientador: Gúbio Soares Campos.

Co-Orientadora: Silvia Inês Sardi.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1.Gastroenterologia. 2. Diarréia. 3.Vírus - Diagnóstico. I. Campos, Gúbio Soares. II. Sardi, Silvia Inês. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU- 616.34

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia
Av. Reitor Miguel Calmon, s/n – Vale do Canela
40110-100, Salvador-BA - Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail:renorbioba@hotmail.com

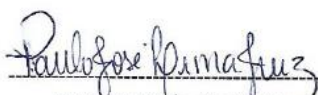
ATA – DEFESA DE TESE

Ata de Defesa de Tese de Doutorado da aluna **Fabiana Lopes de Paula**. Aos vinte e nove dias do mês de agosto do ano de dois mil e quatorze, às dez horas no Auditório Ophélia Gaudenzi terceiro andar no Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA) se reúne em sessão pública, a Banca Examinadora de Defesa de Tese composta pelos Professores e Doutores: **Gúbio Soares Campos** orientador, **Lília Ferreira de Moura Costa**, **Paulo José Lima Juiz**, **Fábio Alexandre Chinalia**, **Josilene Borges Torres Lima Matos** perante o qual a Doutoranda **Fabiana Lopes de Paula**, aluno regularmente matriculado no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Bahia, defendeu, para preenchimento do requisito de Doutor, sua tese intitulada "**Identificação, diagnóstico e caracterização molecular do Norovírus humano em pacientes com gastroenterite aguda**". A defesa da referida tese ocorreu, das dez horas às 13h, tendo a Doutoranda **Fabiana Lopes de Paula** sido submetido à sabatina, dispondo cada membro da Banca do tempo para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a Doutoranda Aprovada por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito Satisfatória.

Eu, Gúbio Soares Campos, que presidi a Banca de Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Salvador, vinte e nove de agosto de 2014.



Prof. Dr. Gúbio Soares Campos – UFBA
(Orientador)



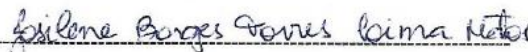
Prof. Dr. Paulo José Lima Juiz - UFRB
(Examinador)



Prof. Dr. Fábio Alexandre Chinalia - UFBA
(Examinador)



Profa. Dra. Lília Ferreira de Moura Costa – UFBA
(Examinadora)



Profa. Dra. Josilene Borges Torres Lima Matos UFBA
(Examinadora)

Dedico este trabalho aos meus pais,
meu alicerce, meu equilíbrio, meu “tudo”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser a luz que ilumina meu caminho, por caminhar sempre do meu lado e por me dar força na conquista de mais uma etapa da vida.

À minha família por ser a minha fortaleza, principalmente aos meus pais, pelo amor incondicional e, em especial, às minhas avós Ema e Ruth, minha irmã Cláudia, meu cunhado René e minha sobrinha Isabella.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gúbio Soares Campos, por ter me aceitado como sua orientanda, pela paciência, confiança e apoio constante.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Sílvia Inês Sardi, por ter me recebido no laboratório, pelos ensinamentos e pelas valiosas colaborações no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Flora, pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência, pelo incentivo, pela atenção e, principalmente, pela amizade desenvolvida.

Ao Prof. Dr. Marcus Welby-Borges, pelas sugestões e correções dos trabalhos.

Às minhas amigas e colegas de laboratório pelo apoio. Em especial a Aryane, Camila, Dellane, Isabela e Julianna por todos esses anos de amizade e companherismo. Obrigada por vocês estarem sempre presente nos momentos de alegrias e pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao curso de Doutorado em Biotecnologia, a todos os professores, funcionários e amigos conquistados, pelos momentos de descontração e aprendizado. Em especial a Jussi pela disponibilidade sempre quando solicitada.

Aos integrantes das bancas examinadoras, de qualificação e da defesa de tese, que gentilmente aceitaram participar e compartilhar seus conhecimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal da Bahia – UFBA pela disponibilização da infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB pelo auxílio na minha capacitação profissional. Em especial aos meus colegas de trabalho e alunos, pela compreensão, apoio e paciência.

A todos aqueles que auxiliaram e/ou participaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Ninguém ignora tudo.

Ninguém sabe tudo.

Todos nós sabemos alguma coisa.

Todos nós ignoramos alguma coisa.

Por isso aprendemos sempre”.

Paulo Freire

RESUMO

A gastroenterite aguda é considerada um importante problema de saúde pública mundial, acometendo aproximadamente dois milhões de mortes por ano no mundo. O Norovírus (NoV), membro da família *Caliciviridae*, gênero *Norovirus*, é um vírus não envelopado, RNA positivo, considerado um importante agente etiológico das gastroenterites não bacterianas. Atualmente, o NoV está classificado em cinco genogrupos (GI-GV) e subclassificados em genótipos, podendo apresentar variantes ou recombinações gênicas. A infecção por NoV acomete indivíduos de todas as idades, com ênfase em crianças e idosos. Neste estudo, durante os anos de 2009 a 2012, foi identificada uma alta frequência da infecção por NoV em crianças com quadros de gastroenterite aguda segundo o teste da reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR). A infecção viral acometeu preponderantemente crianças de faixa etária entre 1 a 2 anos de idade com manifestações clínicas de vômito e diarreia. Foi observada, também, neste trabalho a alta frequência de casos positivos de gastroenterites por NoV entre os meses com maior índice pluviométrico, principalmente no mês de julho de 2010. Para a detecção do NoV, vários métodos de diagnóstico são utilizados, embora o RT-PCR seja o teste padrão-ouro, em unidades hospitalares, os testes imunoenzimáticos (teste imunocromatográfico de fluxo lateral - RIDA[®]QUICK ou ELISA - RIDASCREEN[®]) são preconizados. Um estudo aqui desenvolvido para averiguar a eficácia dos testes imunoenzimáticos, demonstrou que o ELISA apresentou melhor desempenho na detecção do NoV do que o teste imunocromatográfico de fluxo lateral, o que nos permite indicá-lo como teste de diagnóstico, especialmente no processamento de grande número de

amostras. Porém, a realização do RT-PCR ainda é indicada, principalmente na confirmação de resultados e caracterização molecular do vírus. O NoV circulante, detectado na comunidade, foi caracterizado molecularmente e a análise filogenética das cepas isoladas no estudo demonstrou a predominância do genótipo GII.4. As relações filogenéticas das cepas isoladas neste estudo com cepas exclusivamente brasileiras, demonstrou que o GII.4 também é um genótipo predominante no país, assim como em outros países, entretanto, deve-se aprofundar os estudos visando a identificação de cepas variantes e/ou possíveis recombinantes de NoV no Brasil. Este trabalho ajuda a reforçar o compromisso das instituições de saúde na identificação de agentes patológicos nos casos de gastroenterite, em prol do desenvolvimento de campanhas de prevenção que visem reduzir a incidência dos mesmos.

Palavras-chave: Norovírus, gastroenterite, infecção viral

ABSTRACT

Acute gastroenteritis is considered an important public health problem worldwide, affecting about two million deaths worldwide each year. The Norovirus (NoV), a member of the family *Caliciviridae*, genus *Norovirus*, is a non-enveloped viruses, RNA positive, considered an important cause of nonbacterial gastroenteritis. Currently, NoV is classified into five genogroups (GI-GV) and subclassified into genotypes and may exhibit variants or genetic recombinations. NoV infections affect individuals of all ages, with an emphasis on children and the elderly. In the present study, between the years 2009 and 2012, was identified by the reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR), high frequency of NoV infection in children with acute gastroenteritis. Among children, the age group most affected by the infection was 1-2 years old; and the clinical manifestations were vomit and diarrhea. It was also observed high frequency of positive cases for NoV infection among the months with the highest rainfall, from May to August. The detection of NoV, involves the use of several methods, being the RT-PCR the gold standard; however, the most widely used in hospitals are enzyme immunoassays (immunochromatographic rapid tests - RIDA[®]QUICK and ELISA - RIDASCREEN[®]). In the study to investigate the efficacy of the enzyme immunoassays, it can be seen that ELISA showed better performance in detecting NoV, which allows indicating it as a diagnostic test, especially when processing large numbers of samples. However, the RT-PCR is still indicated, mainly in confirming results and molecular characterization of the virus. The NoV circulating, detected in the community, was submitted to molecular characterization and phylogenetic analysis of the isolate strains demonstrated the predominance of genotype GII.4. The phylogenetic relationships of the isolates in this study

and the Brazilian strains showed that GII.4 is the predominant genotype in the country, however, further studies should be performed to identify variants and/or possible recombinant NoV strains in Brazil. This study allows reinforcing the health institutions in identifying pathogens that causes gastroenteritis, for the development of prevention campaigns aimed at reducing the incidence of the same.

Key-words: Norovirus, gastroenteritis, viral infection

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Estrutura morfológica do NoV.....	24
Figura 02	Organização genômica do NoV.....	24
Figura 03	Organização da ORF2 do genoma do NoV.....	26
Figura 04	Estrutura do capsídeo viral do NoV.....	27
Figura 05	Classificação do NoV.....	31
Figura 06	Mecanismo de replicação dos Calicivírus	33
Figura 07	Representação esquemática dos locais de interação do NoV com receptores HBGA	34
Figura 08	Mecanismo de replicação do NoV	35
Figura 09	Representação esquemática das regiões utilizadas para o desenho dos iniciadores	44

MANUSCRITO 1

Figura 01	Total de amostras analisadas pelo teste ELISA (Ridascreen [®] Norovirus 3 ^a geração, R-Biopharm, Alemanha)	72
Figura 02	Resultado das amostras positivas analisadas por ELISA, em relação ao gênero	72

MANUSCRITO 2

Figura 01	Distribuição dos agentes virais causadores da gastroenterite nas crianças deste estudo	86
Figura 02	Distribuição dos agentes bacterianos causadores da gastroenterite nas crianças deste estudo	87
Figura 03	Distribuição das infecções mistas causadoras da gastroenterite nas crianças deste estudo	87

MANUSCRITO 3

Figura 01	Distribuição das amostras totais, analisadas pela faixa etária	105
-----------	--	-----

MANUSCRITO 4

Figura 01	Árvore filogenética baseada no fragmento parcial do gene da RNA polimerase RNA dependente do Norovírus humano GI e GII	125
-----------	--	-----

LISTA DE GRÁFICOS

MANUSCRITO 1

Gráfico 01	Distribuição das amostras por faixa etária nas crianças com gastroenterite, analisadas por ELISA	73
------------	--	----

MANUSCRITO 2

Gráfico 01	Sazonalidade das infecções virais no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2010	90
------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Funções das proteínas não estruturais codificadas pela ORF1	25
MANUSCRITO 2		
Tabela 01	Distribuição dos agentes etiológicos virais da gastroenterite entre as faixas etárias das crianças atendidas na emergência pediátrica	88
Tabela 02	Principais sintomatologias gastrointestinais observadas nas crianças atendidas na emergência pediátrica	89
MANUSCRITO 3		
Tabela 01	Distribuição das amostras positivas para NoV analisadas por faixa etária.	106
Tabela 02	Distribuição das amostras negativas para os testes RIDA [®] QUICK e RIDASCREEN [®] Norovírus	106
Tabela 03	Deteção de NoV em amostras fecais com RT-PCR e RIDA [®] QUICK Norovírus	107
Tabela 04	Deteção de NoV em amostras fecais com RT-PCR e RIDASCREEN [®] Norovírus	108
Tabela 05	Compação da sensibilidade e especificidade dos testes RIDASCREEN [®] Norovírus 3 ^a geração e RIDA [®] QUICK Norovírus	108
MANUSCRITO 4		
Tabela 01	Distribuição das amostras positivas analisadas por faixa etária	126

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Aminoácido
C	Domínio C-terminal
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> (Centros de controle e prevenção de doenças)
DDBJ	<i>DNA Data Bank of Japan</i> (Banco de dados de DNA do Japão)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Teste de imunoadsorção ligado à enzima)
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i> (Laboratório Europeu de Biologia Molecular)
FBVE	<i>Foodborne Viruses in Europe</i>
G	Genogrupo
HGBA	<i>Histo-Blood Group Antigens</i> (Antígenos do grupo sanguíneo)
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia Viral)
IFN- γ	Interferon gama
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
KDa	Kilodaltons
Kb	Kilobase
ME	Microscopia eletrônica
N	Domínio N-terminal

NIH	<i>National Institutes of Health</i>
Nm	Nanômetro
NLVs	<i>Norwalk-like vírus</i>
NoV	Norovírus
ORF	<i>Open reading frame</i> (Região aberta de leitura)
P	Domínio <i>Protuding</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription – polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa)
VLPs	<i>Virus-Like Particles</i> (Partículas semelhantes ao vírion)
VP	<i>Viral protein</i> (Proteína viral)
VPg	<i>Virus protein genome</i> (Proteína viral associada ao genoma)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Histórico	21
2.2	Estrutura morfológica, genômica e proteica.....	23
2.3	Classificação.....	29
2.4	Mecanismo de replicação	32
2.5	Patogênese e manifestações clínicas	37
2.6	Epidemiologia	39
2.7	Diagnóstico laboratorial	42
2.8	Prevenção, controle e tratamento	45
3	OBJETIVOS	49
3.1	Objetivo geral	49
3.2	Objetivos específicos	49
4	REFERÊNCIAS	50
5	MANUSCRITO 1 Detecção de Norovírus em crianças com gastroenterite aguda assistidas em uma emergência na cidade de Salvador	63
6	MANUSCRITO 2 Detecção dos agentes etiológicos da diarreia aguda em crianças de uma unidade de emergência pediátrica	77
7	MANUSCRITO 3 Avaliação da eficácia de testes imunoenzimáticos para a detecção de Norovírus em amostras fecais	97
8	MANUSCRITO 4 Genealogy of circulating Norovirus in Brazil	116
9	CONCLUSÕES	126
10	PERSPECTIVAS FUTURAS	127
	ANEXO 1	128
	ANEXO 2	129

1 INTRODUÇÃO

A gastroenterite aguda, que acomete anualmente em média 700 milhões de crianças menores de cinco anos de idade, é considerada um importante problema de saúde pública mundial, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. Embora com baixos índices de mortalidade nos países desenvolvidos, esta patologia é responsável por aproximadamente dois milhões de mortes por ano em todo o mundo (OKITSU-NEGISHI et al., 2004; WHO, 2009).

Os principais agentes etiológicos associados a esta patologia são parasitas, fungos, bactérias e vírus (LI et al., 2012). Desde a década de 30 existia uma suspeita de que os agentes virais estariam associados à gastroenterite, entretanto, apenas em 1972 Kapikian e colaboradores identificaram o primeiro vírus, “*Norwalk virus*”, como causa de gastroenterite aguda (ATMAR; ESTES, 2006).

O Norovírus (NoV), considerado o principal agente etiológico da gastroenterite aguda de origem não bacteriana em todo o mundo (GLASS et al., 2009), está associado a casos esporádicos e não esporádicos (surtos) e apresenta rápida disseminação (ATMAR; ESTES, 2006).

A transmissão do NoV ocorre, principalmente, pela ingestão de água e alimentos contaminados (RABENAU et al., 2003) e permanece estável no ambiente por longos períodos, necessitando de baixas doses para causar infecção. Suas principais manifestações clínicas são vômitos, diarreia, dores abdominais e febre (HUTSON et al., 2004; WIDDOWSON et al., 2005).

O diagnóstico do NoV é baseado na detecção do vírus em amostras de fezes por microscopia eletrônica, métodos imunoenzimáticos ou reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) (GREEN et al., 1995).

Com o advento da biologia molecular, várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de aprimorar o conhecimento do NoV e, conseqüentemente, desenvolver vacinas e drogas antivirais para a prevenção e tratamento destas infecções virais, pois até o momento, não existem vacinas e medidas terapêuticas eficazes para as mesmas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

O primeiro relato de gastroenterite foi descrito por Zahorsy em 1929, quando o pesquisador propôs a expressão “*winter vomiting disease*” para descrever o aumento da incidência de surtos de gastroenterite não bacteriana, durante os meses de inverno nos Estados Unidos, cujas características clínicas predominantes eram vômito, dores abdominais e diarreia (ATMAR; ESTES, 2006).

Na década de 40, Gordon e colaboradores descreveram, pela primeira vez, a relação entre o agente etiológico viral e o desenvolvimento da gastroenterite, bem como a transmissão do agente viral entre humanos, durante surtos de gastroenterite não bacteriana nos Estados Unidos (ATMAR; ESTES, 2006). A transmissão do agente viral causador da gastroenterite também foi observada, posteriormente, no ano de 1968, no período de outubro a novembro, em uma escola primária na cidade de Norwalk (Ohio, Estados Unidos) (GREEN et al.,1995; KAPIKIAN, 2000; WIDDOWSON et al., 2005; BORGES et al.,2006).

No entanto, apenas em 1972, Kapikian e colaboradores identificaram o primeiro vírus associado à gastroenterite aguda, considerado como protótipo do Norovírus (NoV), através da imunomicroscopia eletrônica, onde observou-se agregados de partículas “*virus-like*” de 27 nm, a partir de filtrado de fezes (GREEN et al.,1995; KAPIKIAN, 2000; WIDDOWSON et

al., 2005; BORGES et al., 2006). Devido às características morfológicas visualizadas, este vírus foi inicialmente denominado “*small round-structured viruses*” (SRSVs) ou “*small round viruses*” e, após a clonagem e sequenciamento do genoma do vírus, essas denominações deixaram de ser utilizadas e o vírus foi denominado “*Norwalk-like virus*” (NLVs) e, posteriormente Norovírus; classificado como gênero *Norovirus*, da família *Caliciviridae* (CDC, 2001; ATMAR; ESTES, 2006).

2.2 ESTRUTURA MORFOLÓGICA, GENÔMICA E PROTEICA

A família *Caliciviridae* foi criada em 1979 pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral – ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) e seu nome deriva da palavra latina “*calix*”, que significa cálice e se refere à morfologia icosaédrica do capsídeo, quando observada por microscopia eletrônica (ME) (GREEN et al., 2000).

Os vírus pertencentes a esta família compartilham algumas características em comum, como: a) os vírions apresentam morfologia icosaédrica, formada pela proteína principal do capsídeo (VP1); b) o genoma é composto por uma fita simples linear de RNA de polaridade positiva; c) o terminal 5' está ligado de forma covalente a uma pequena proteína VPg, codificada pelo genoma viral; d) o terminal 3' apresenta uma cauda poliadenilada (poli A) ligada covalentemente ao seu genoma; e) apresenta duas ou três fases abertas de leitura (ORFs – *Open Reading Frame*); f) as proteínas do capsídeo são produzidas a partir de um RNA subgenômico, durante a replicação do vírus (PRASAD et al., 1994; CLARKE; LAMBDEN, 1997; GREEN et al., 2000; KARST, 2010).

O NoV é um vírus pequeno com aproximadamente 27-40nm de diâmetro, não envelopado, esférico, com capsídeo de morfologia icosaédrica formado por duas proteínas, VP1 e VP2 (GLASS et al., 2009; ATMAR, 2010) (**Figura 01**).

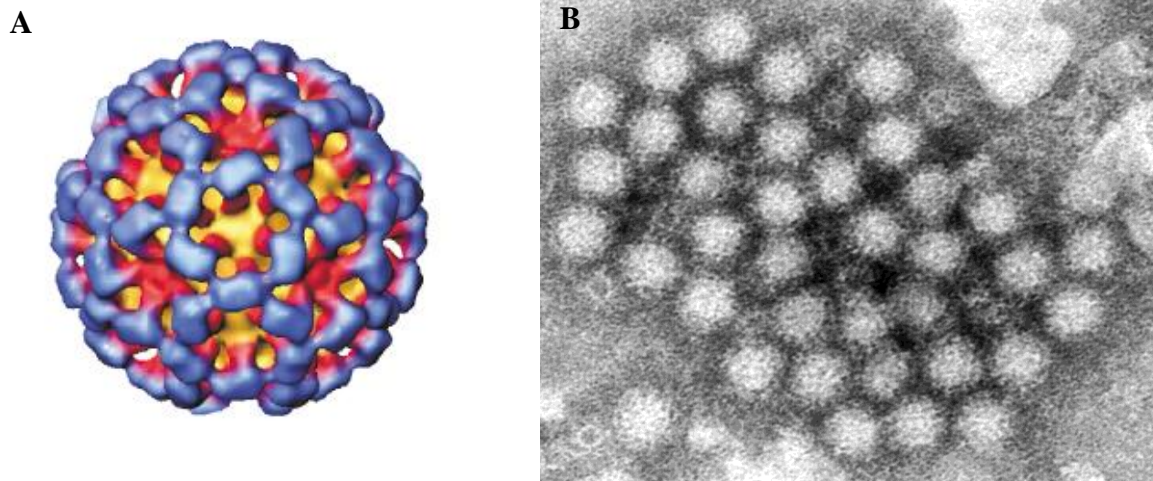


Figura 01: Estrutura morfológica do NoV. A) Representação esquemática da partícula viral de NoV (Adaptado de HUTSON et al., 2004). B) Partículas virais do NoV visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. Fonte: <http://www.cdc.gov/HAI/organisms/norovirus.html>

O genoma viral é composto por uma fita simples linear de RNA com 7,5 a 7,7 Kilobase (Kb) de comprimento e de polaridade positiva, organizado em três fases abertas de leitura (ORF – *open read frame*) (HARDY, 2005), sendo ligado de forma covalente à proteína VPg no terminal 5', com função de iniciar a replicação do genoma e conduzir a tradução das proteínas virais, e a uma cauda poliadenilada (poli A) no terminal 3', com função de dar estabilidade à molécula e auxiliar na tradução (ROHAYEM et al., 2006; KARST, 2010) (Figura 02).

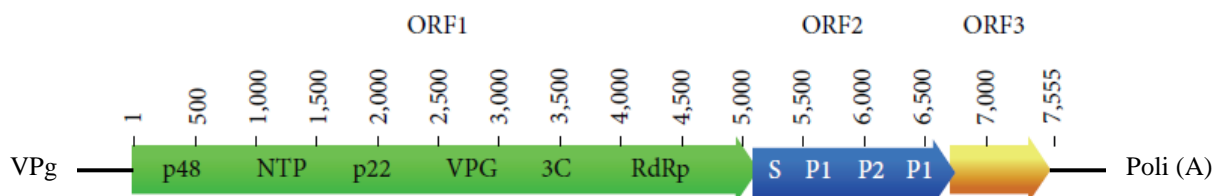


Figura 02: Organização genômica do NoV. Representação esquemática do genoma viral e seus produtos proteicos (Adaptado de YU et al., 2014).

A primeira ORF tem aproximadamente 5Kb, está localizada no primeiro terço do genoma e codifica uma poliproteína de 200 kilodaltons (kDa) que, após a tradução, é clivada em 7 proteínas (NS1-NS7) não estruturais na seguinte ordem: NS1; NS2 ou p48 (proteína de 48 kDa); NS3 ou NTP (nucleosídeo trifosfatase); NS4 ou p22 (proteína de 22 kDa); NS5 ou VPG; NS6, Pro, 3C ou 3CL_{Pro} (3C-like protease); NS7, Pol ou RdRp (RNA polimerase RNA dependente), cujas funções estão descritas na tabela abaixo (**Tabela 01**) (BELLIOT et al., 2003; HARDY, 2005; SOSNOVTSEV et al., 2006; DONALDSON et al., 2010; KARST, 2010; YU et al., 2014). Essas proteínas, que são essenciais para a replicação viral, são processadas co- e pós-traducionalmente pela 3C-like protease (DONALDSON et al., 2010).

Tabela 01: Funções das proteínas não estruturais codificadas pela ORF1.

Nome da proteína	Função (ões)	Referência (s)
NS1	Função indefinida	
NS2 ou p48	Envolvida no transporte intracelular de proteínas virais e na formação do complexo de replicação viral	ETTAYEBI; HARDY, 2003; FERNANDEZ-VEGA et al., 2004; SCIPIONI et al., 2008
NS3, NTP ou NTPase	Proteína com atividade NTPase (hidrolisa ATP), porém sem atividade helicase (incapaz de desenrolar uma fita de RNA)	HARDY, 2005
NS4 ou p22	Envolvida no transporte da membrana celular e na formação do complexo de replicação viral	SCIPIONI et al., 2008
NS5, VPG ou VPg	Envolvida na tradução do RNA viral (recrutamento dos ribossomos pelo RNA viral)	HARDY, 2005
NS6, Pro, 3C ou 3CL _{Pro}	Clivagem da poliproteína ORF1 (formação das proteínas não estruturais)	SCIPIONI et al., 2008
NS7, Pol ou RdRp	Proteína com função importante na iniciação da síntese do RNA viral (replicação do genoma viral)	ESTES et al., 2006

A ORF2 apresenta 1,8 Kb de comprimento e possui aproximadamente 60 KDa de massa molecular. Ela codifica a maior proteína estrutural (57 KDa), a VP1, que está organizada em dois domínios principais: S (*shell*) e P (*protuding*), unidos por uma região dobradiça, flexível (*hinge*), e tem como função a formação do capsídeo viral (BERTOLOTTI-CIARLET et al., 2002; HARDY, 2005; DONALDSON et al., 2010; KARST, 2010). O domínio S (*shell*), parte interna do capsídeo, envolve o genoma viral, é um domínio relativamente conservado e é denominado braço N-terminal (TAN; JIANG, 2007; KARST, 2010). O domínio P (*protuding*), denominado C-terminal, é mais variável e está subdividido em dois subdomínios, um mais interno denominado P1 e outro mais externo denominado P2, responsáveis por formar as protrusões proeminentes do capsídeo viral (BERTOLOTTI-CIARLET et al., 2002; TAN; JIANG, 2007; KARST, 2010).

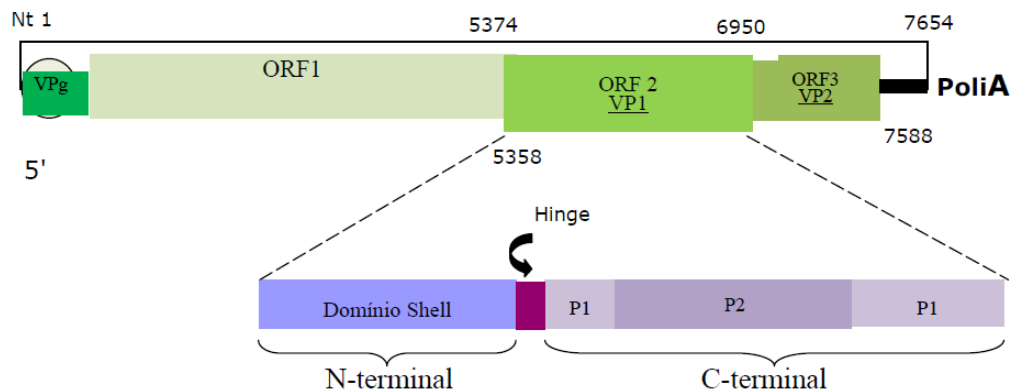


Figura 03: Organização da ORF2 do genoma do NoV. Representação esquemática dos domínios e subdomínios da ORF2 (Adaptado de GREEN, 2007 e DONALDSON et al., 2008).

A terceira ORF, com 0,6 Kb de comprimento, codifica uma pequena proteína estrutural básica denominada VP2, constituída por 208-268 aminoácidos (aa), com massa

molecular de aproximadamente 22 a 29 KDa. Na partícula viral, podem estar presentes uma ou duas cópias desta proteína, que tem como funções o empacotamento do RNA viral e o aumento da estabilidade da proteína VP1, protegendo-a da degradação das proteases durante a montagem do capsídeo (BERTOLOTTI-CIARLET et al., 2003; HARDY, 2005; DONALDSON et al., 2010) (**Figura 04**).

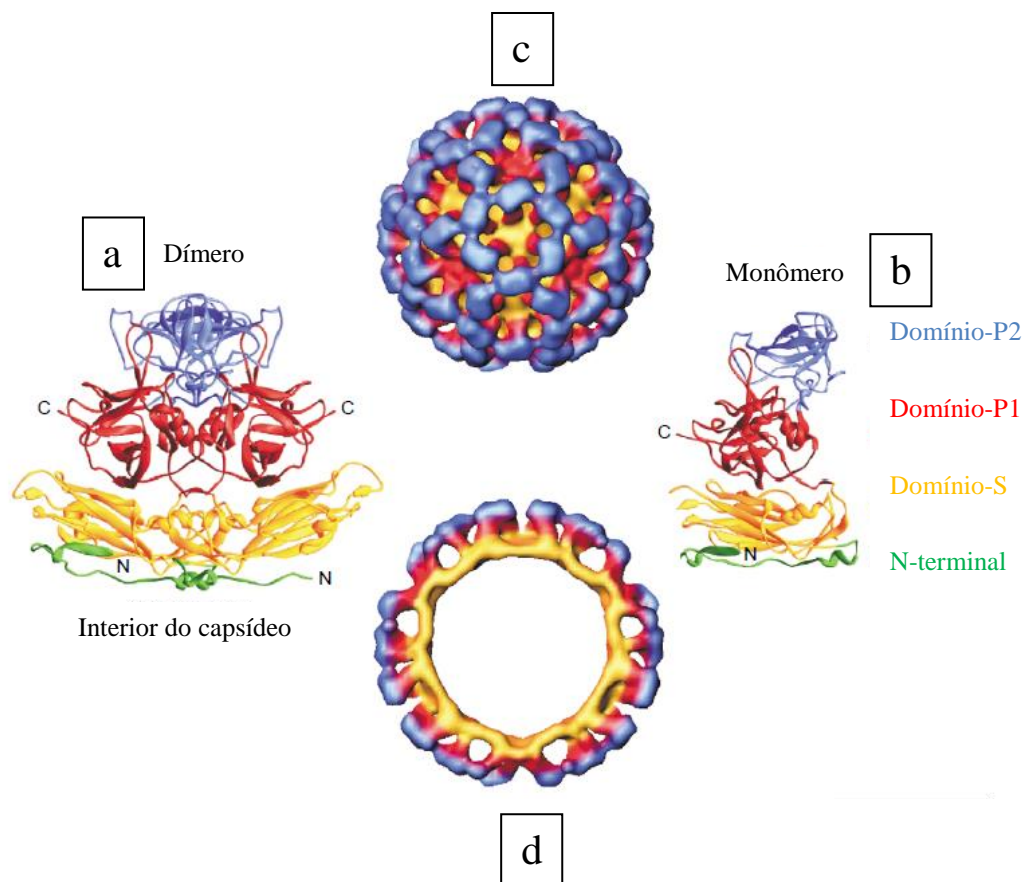


Figura 04: Estrutura do capsídeo viral do NoV. A partícula do NoV (VLP NoVs) possui 90 dímeros da proteína do capsídeo montados em simetria icosaédrica (a). Cada proteína monomérica do capsídeo está dividida em uma região N-terminal (em verde) de frente para o interior da VLP; um domínio *Shell* (Domínio-S, em amarelo), que forma a superfície contínua da VLP; um domínio saliente (Domínio-P), que origina da superfície do Domínio-S. O Domínio-P encontra-se dividido em dois subdomínios P1 (em vermelho) e P2 (em azul), com

o subdomínio-P2 na superfície mais distal da VLP (b). As figuras (c) e (d) representam o corte transversal e o fundo da VLP, respectivamente (Adaptado de HUTSON et al., 2004).

O NoV apresenta também um RNA subgenômico, que está presente no momento da replicação viral, com aproximadamente 2 Kb de comprimento, de polaridade positiva, contendo ORF2 e ORF3, responsáveis por codificar as proteínas estruturais. Similar ao RNA genômico, ele é covalentemente ligado ao VPg no terminal 5' e à cauda poliA no terminal 3' (JIANG et al., 1993; CLARKE; LAMBDEN, 1997; BERTOLOTTI-CIARLET et al., 2003; KARST, 2010).

2.3 CLASSIFICAÇÃO

O Norovírus (NoV), anteriormente denominado “*Norwalk-like virus*” (NLVs), pertence a família *Caliciviridae*, gênero *Norovirus*. Os outros gêneros que compõem essa família são: *Sapovirus*, previamente denominado como “*Sappo-like viruses*” (SLVs), *Lagovirus*, *Vesivirus* e *Nebovirus* (anteriormente denominado *Becovirus*) (GREEN et al., 2000; GREEN, 2007). Alguns autores sugerem ainda a existência de outros dois gêneros, o *Recovirus*, que infectam macacos e humanos (FARKAS et al., 2008; SESTAK et al., 2012; SMITS et al., 2012) e o *Valovirus*, que infectam suínos e frangos (L’HOMME et al., 2009; WOLF et al., 2011), os quais ainda estão em fase de revisão pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral – ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*).

Os vírus pertencentes ao gênero *Norovirus* e o *Sapovirus* são considerados importantes agentes etiológicos da gastroenterite em humanos e outros animais como suínos, bovinos, caninos, felinos e murinos. Por outro lado, os vírus pertencentes aos gêneros *Lagovirus*, *Vesivirus* e *Nebovirus* têm importância apenas veterinária, pois são responsáveis por infectar animais como coelhos, gatos e bovinos (ZHENG et al., 2006; GREEN, 2007).

O NoV é classificado em genogrupos, representados pela letra “G” seguida por número romano, e genótipos (ou *clusters*), representados por número arábico e separados do genogrupo por um ponto.

Baseado na diversidade genética da sequência completa de aminoácidos que codifica a proteína VP1 (ORF2), 5 genogrupos (GI-GV) são identificados em diferentes hospedeiros, entre eles: humanos (GI, GII e GIV), suínos (GII), bovinos (GIII), caninos e felinos (GIV) e

murinos (GV) (LEVETT et al., 1996; ZHENG et al., 2006; ATMAR, 2010). Entretanto, tem sido proposta, por alguns autores, a existência do sexto genogrupo (GVI), o qual foi identificado em caninos (MARTELLA et al., 2009; MESQUITA et al., 2010).

A quantidade dos diferentes genótipos do NoV existentes ainda não está totalmente definida, devido ao constante surgimento de novas cepas e devido a desacordos quanto à definição da melhor região genômica para estabelecer esta quantificação. Até os dias atuais, as análises da sequência completa do gene que codifica a proteína VP1 (ORF2) e da sequência do gene da RNA polimerase RNA dependente (RdRp) (ORF1) do genoma viral são amplamente utilizadas para classificar as cepas de NoV quanto aos genótipos (ANDO et al., 2000; VINJÉ et al., 2004; ZHENG et al., 2006; KRONEMAN et al., 2013).

Baseado em análises da sequência completa do gene que codifica a proteína VP1 (ORF2), inicialmente foram identificados 32 genótipos de NoV (ZHENG et al., 2006) e, mais recente, Hall e colaboradores identificaram mais três genótipos diferentes, sendo 8 genótipos pertencentes ao GI, 21 ao GII, 3 ao GIII, 2 ao GIV e 1 ao GV (HALL et al., 2011) (**Figura 05**).

Dentre as diferentes cepas de NoV encontradas nos humanos, as GII.4 são as mais prevalentes no mundo e consideradas responsáveis, desde 2001, pela maioria dos surtos de gastroenterites virais no mundo (DONALDSON et al., 2008; SIEBENGA et al., 2009). Alguns autores sugerem que a presença de variantes de GII.4, detectadas na região D do capsídeo viral (ORF2), seria uma possível causa da prevalência das cepas GII.4 no mundo todo (FRANKHAUSER et al., 2002; TU et al., 2008; MATTISON et al., 2009; FERREIRA et al., 2012; AHMED et al., 2013; ARAGÃO et al., 2013; SILVA et al., 2013).

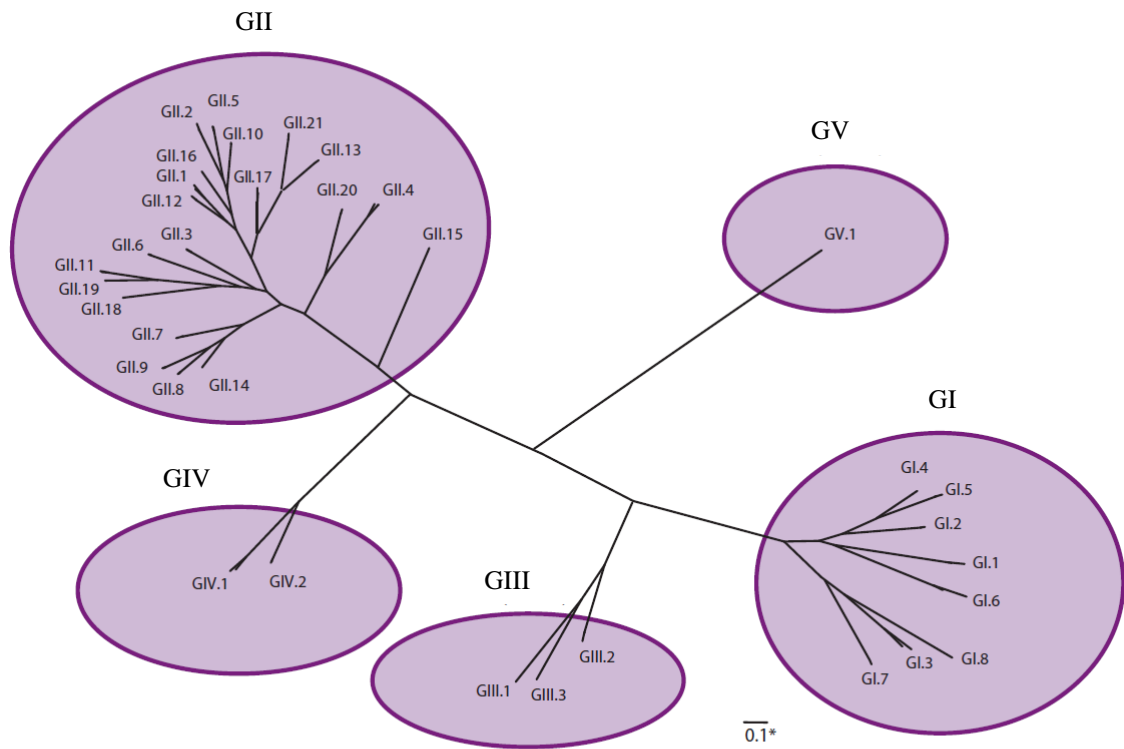


Figura 05: Classificação do NoV. Classificação baseada na diversidade genética da sequência completa de aminoácidos do gene que codifica a proteína VP1 (ORF2). As cepas de NoV são classificadas em 5 genogrupos (GI-GV) e 35 genótipos (Adaptado de HALL et al., 2011).

2.4 MECANISMO DE REPLICAÇÃO

O local exato onde ocorre a replicação do NoV e o seu mecanismo de replicação ainda não estão totalmente esclarecidos. Acredita-se que a replicação ocorra nas células epiteliais do trato intestinal superior e que o mecanismo de replicação apresente semelhança com os outros vírus que possuem genoma de RNA com polaridade positiva. Nestes vírus, a replicação acontece em sete etapas: (a) interação do vírus com a célula hospedeira através de receptores específicos, (b) entrada da partícula viral na célula hospedeira, (c) desnudamento do genoma no citoplasma da célula hospedeira, (d) tradução do genoma viral, (e) replicação do genoma viral, (f) maturação e (g) liberação das partículas virais através da membrana plasmática (GREEN, 2007) (**Figura 06**).

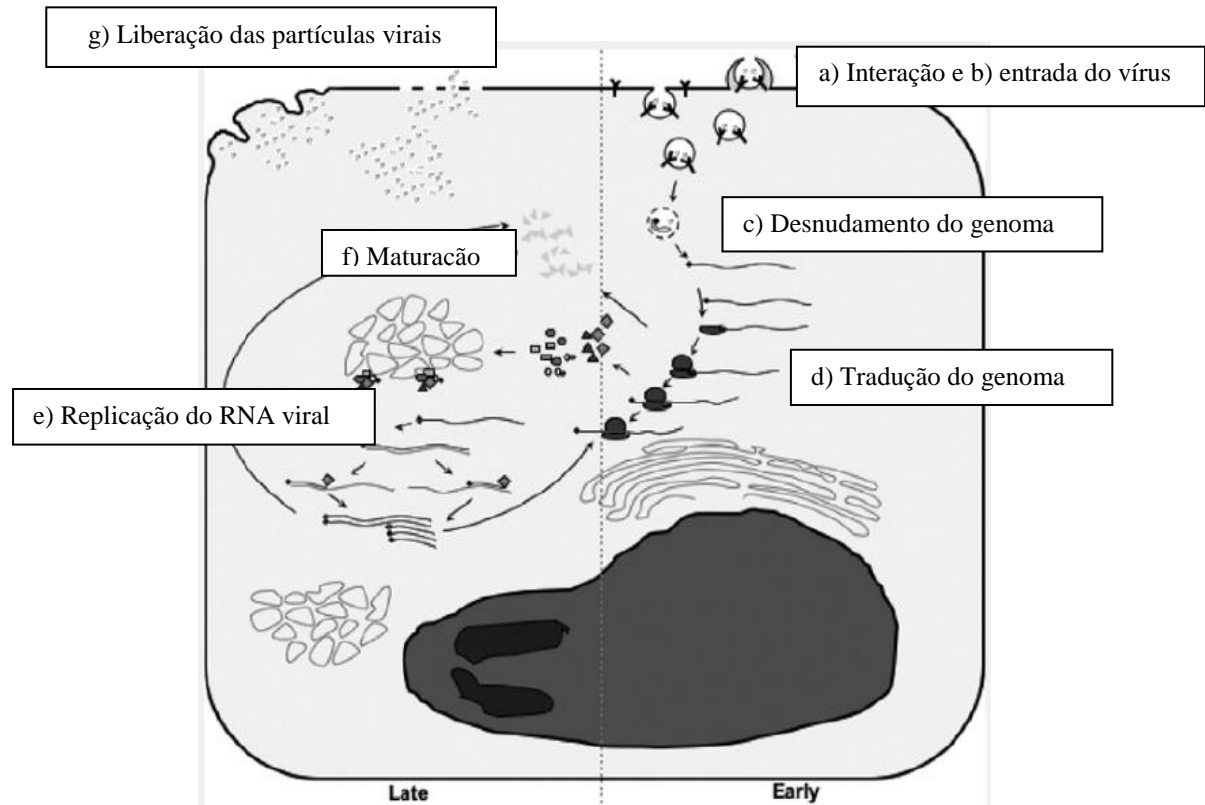


Figura 06: Mecanismo de replicação dos Calicivírus. Representação esquemática do mecanismo de replicação dos vírus de RNA de polaridade positiva (Adaptado de GREEN et al., 2007).

Até o momento, sabe-se que o NoV reconhece receptores específicos presentes na célula hospedeira, denominados antígenos do grupo sanguíneo (HGBA – *Histo-Blood Group Antigens*). Esses receptores podem ser encontrados como carboidratos complexos nas membranas plasmáticas das células de vários tecidos humanos (eritrócitos e células epiteliais dos tratos gastrointestinal e respiratório) ou como oligossacarídeos livres em líquidos biológicos (sangue, saliva, leite e secreções intestinais) (MARIONNEAU et al., 2001; HUANG et al., 2005; MURAKAMI et al., 2013).

A interação dos receptores HGBAs com o NoV é considerada uma interação típica carboidrato-proteína, que ocorre no domínio P (*protuding*) do capsídeo viral. Assim, qualquer mudança em um único aminoácido presente no domínio P, pode alterar essa interação; situação observada na interação dos diferentes genótipos (GI e GII) com os HGBAs (TAN; JIANG, 2010) (**Figura 07**).

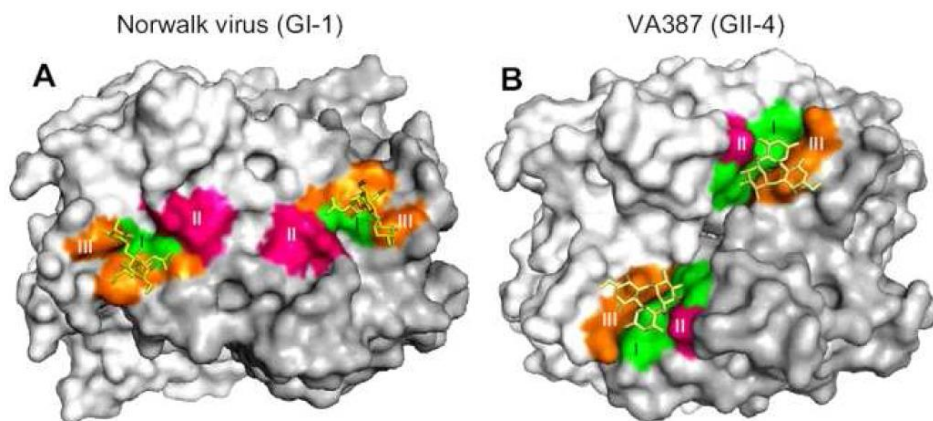


Figura 07: Representação esquemática dos locais de interação do NoV com receptores HBGA. Estrutura cristalizada da interface de ligação dos HGBAs e os genótipos I (A) e II (B). Os dímeros estão representados na cor cinza (um monômero é mais escuro que o outro) e os três principais componentes da interface de ligação dos HGBAs nas cores verde, vermelho e laranja. O HBGA é representado pela cor amarela. Embora os locais de ligação em ambos os genótipos encontrem-se no domínio P2, o local exato de ligação dos HGBAs diferem entre si (Adaptado de TAN; JIAN, 2010).

Após a interação com os HGBAs, o NoV entra na célula epitelial do trato gastrointestinal e libera o seu genoma no citoplasma celular (BALL, 2007). O genoma do NoV por apresentar polaridade positiva, atua como molde para a síntese de uma fita de polaridade negativa, da qual são produzidas os RNAs genômico e subgenômico

(GOODFELLOW et al., 2005; ROHAYEM et al., 2006; DONALDSON et al., 2008; ATMAR, 2010) (**Figura 08**).

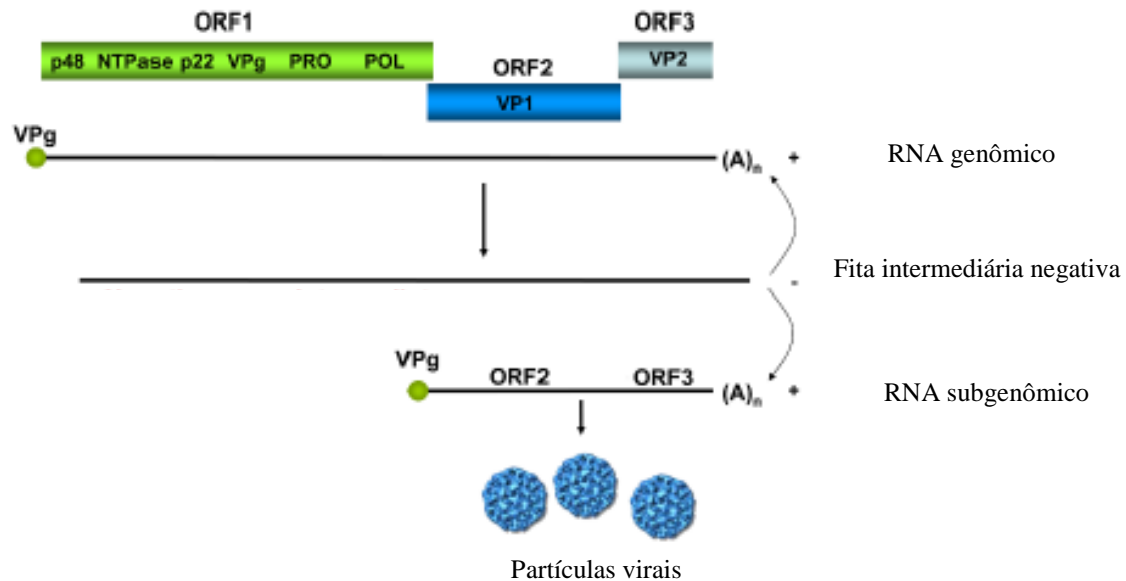


Figura 08: Mecanismo de replicação do NoV. A replicação acontece a partir de uma fita intermediária negativa, da qual o RNA genômico e subgenômico são produzidos (Adaptado de ATMAR, 2010).

O RNA genômico é responsável pela síntese das proteínas não estruturais (NS1-NS7), que são originadas a partir da clivagem pela RdRp, e pela síntese das novas moléculas de RNA genômico, formadas através do processo de replicação com o próprio RNA (ASANAKA et al., 2005; GREEN, 2007; GUIX et al., 2007). Por outro lado, o RNA subgenômico tem a função de codificar as proteínas estruturais (ORFs 2 e 3) e, conseqüentemente, de produzir as proteínas VP1 e VP2 (BALL, 2007; GREEN, 2007; KARST, 2010; ATMAR, 2010).

Finalmente, após a expressão das proteínas estruturais advindas da tradução de moléculas de RNA subgenômico, o capsídeo viral é montado e o RNA viral é empacotado, formando as partículas virais infecciosas, as quais serão liberadas posteriormente através da membrana plasmática da célula hospedeira por lise celular (ASANAKA et al., 2005; GUIX et al., 2007).

2.5 PATOGÊNESE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O NoV é transmitido por via oral, água e alimentos contaminados; por via respiratória, através de aerossóis produzidos pelos vômitos de indivíduos infectados e pelo contato direto com pessoas infectadas (MARKS et al., 2003; ATMAR; ESTES, 2006; KARST, 2010).

Este vírus é ácido-resistente, com a capacidade de sobreviver à ação do suco gástrico e, como descrito anteriormente, admite-se que sua replicação ocorra na porção jejunal do intestino delgado, onde ocorre a infecção primária (GREEN, 2007).

Apesar das infecções por NoV, na maioria das vezes, resultarem em algumas manifestações clínicas (infecções sintomáticas), há relatos na literatura da existência de infecções assintomáticas (KARST, 2010).

Quando as infecções são sintomáticas, após um curto período de incubação (12-48h), ocorrem as principais manifestações clínicas que são caracterizadas, na maioria das vezes, por episódios repetidos de diarreia aguda, que pode ter duração de 12 a 60 horas, frequentemente associados a outros sintomas como: vômitos, náuseas, febre, dores abdominais, dores de cabeça e mialgias (PARKS et al., 1999; RABENAU et al., 2003).

O aparecimento da diarreia pode ser explicado pelos resultados das biópsias de indivíduos infectados, onde é observada inflamação na mucosa intestinal e aparência anormal das células epiteliais absortivas, com expansão dos vilos e encurtamento dos microvilos, provocando lesões na mucosa. Após duas semanas da infecção, essa aparência histológica anormal do intestino delgado desaparece e a normalidade do tecido é restabelecida. Por outro lado, as náuseas e vômitos, observados durante o período da infecção, podem estar associados

à gastroparesia transitória, que cessa com o término da infecção viral (LOPMAN et al., 2002; TROEGER et al., 2009).

Geralmente, essas manifestações clínicas ocorrem de forma branda e são autolimitadas (RABENAU et al., 2003; KARST, 2010); entretanto, quando elas são persistentes, podem ocorrer casos de desidratação e comprometimento nutricional, resultando, eventualmente, em morte do paciente (PARKS et al., 1999; MORILLO et al., 2008). Segundo Chen et al. (2009), raros casos de convulsão em crianças associados à infecção por NoV também podem acontecer.

2.6 EPIDEMIOLOGIA

O NoV infecta indivíduos de todas as idades, o que raramente ocorre com os outros vírus causadores da gastroenterite (GLASS et al., 2000). Esse vírus é, geralmente, encontrado em ambientes onde há aglomerados de pessoas, como: escolas, creches, quartéis militares, cruzeiros marítimos, festivais de música e, com maior frequência, em hospitais e asilos (FRANKHAUSER et al., 2002; ZAKIKHANY et al., 2012; BOTELHO-NEVERS; GAUTRET, 2013).

A infecção por NoV ocorre durante todo o ano (ATMAR; ESTES, 2006), com um padrão de sazonalidade diferente nos dois hemisférios. No hemisfério Norte as infecções são mais comuns no inverno e no início da primavera, enquanto que, no hemisfério Sul elas ocorrem com maior frequência na primavera e no verão (MARSHALL et al., 2003).

No Brasil, ainda não se tem um padrão de sazonalidade definido, pois poucos estudos foram desenvolvidos com esse intuito. Na região Centro-Oeste, os maiores índices de infecção por NoV ocorreram no período chuvoso (BORGES et al, 2006); no Rio de Janeiro, no outono e primavera (VICTORIA et al., 2007) e no Espírito Santo, durante a seca (RIBEIRO et al., 2008).

O NoV é responsável por 50% de todas as gastroenterites no mundo, incluindo aquelas causadas por bactérias e parasitas. Considerando apenas as gastroenterites virais, o NoV é responsável por 73 a 95% dos surtos e de 5 a 48% dos casos esporádicos (ATMAR; ESTES, 2006).

Estima-se que, a cada ano, o NoV é responsável por 64.000 episódios de diarreia com necessidade de hospitalização, 900.000 visitas de crianças a médicos registradas em países industrializados e 200.000 mortes de crianças menores de cinco anos de idade em países em desenvolvimento (PATEL et al., 2008), sendo considerado como a segunda causa mais comum de hospitalizações por gastroenterite em crianças, seguido pelo rotavírus (ATMAR; ESTES, 2006; PATEL et al., 2008).

O NoV pode aparecer periodicamente de forma global ou nacional, substituir outras cepas previamente circulantes e aumentar a incidência da doença (WIDDOWSON et al., 2005). Neste contexto, é observada desde a década de 90, a associação das cepas GII.4 com as epidemias de gastroenterite resultantes da infecção por NoV (FRANKHAUSER et al., 2002; TU et al., 2008).

A primeira variante GII.4 associada à epidemia global, US95/96, foi detectada inicialmente durante dois surtos de gastroenterite ocorridos nas cidades de *Lymington* e *Southampton*, Reino Unido, em fevereiro de 1995. Posteriormente, ela foi detectada nos Estados Unidos em abril de 1995; no Brasil, Canadá, Austrália e Holanda no final de 1995; Austrália, Holanda e China, em 1996; e na Alemanha, antes de outubro de 1997, o que sugere que esta cepa também estava circulando em todo o mundo durante este período (NOEL et al., 1999).

Em 2002, outra variante, denominada “Farmington Hills vírus”, foi identificada em cruzeiros, restaurantes, asilos, creches, causando epidemias de gastroenterite na Europa, nos Estados Unidos e Austrália (WIDDOWSON et al., 2003).

Nos anos de 2004 e 2006 foi observada uma epidemia global, onde as infecções por NoV estavam associadas com o surgimento de uma outra variante GII.4, denominada “Hunter

vírus”. Esta cepa foi identificada primeiramente no estado de *New South Wales*, Austrália, em 2004 e, subsequentemente, houve a disseminação por vários países (BULL et al., 2006).

A variante denominada GII.4 2006b, ou Minerva, foi identificada pela primeira vez em dezembro de 2005, na Espanha (KRONEMAN et al., 2006) e, posteriormente, foi disseminada por vários países. Nos Estados Unidos, ela foi responsável por surtos de gastroenterite registrados no final de 2005 e início de 2006 (VEGA et al., 2011); no Canadá, entre julho de 2006 a junho de 2009 (HASING et al., 2013) e na Bulgária, entre dezembro de 2006 a abril de 2007 (MLADENOVA et al., 2008), entre outros países da Europa (KRONEMAN et al., 2006). Sua primeira identificação na China foi em julho de 2006 (LIU et al., 2010) e na Itália em agosto deste mesmo ano (RAMIREZ et al., 2009).

A variante GII.4 New Orleans foi identificada pela primeira vez nos Estados Unidos, em outubro de 2009. Ela causou 60% dos surtos de gastroenterite neste país, durante o período de outubro de 2009 a maio de 2010, e substituiu a cepa GII.4b até então predominante (VEGA et al., 2011).

Em 2012, uma nova cepa variante, denominada GII.4 Sydney, foi detectada em Sydney, Austrália (VAN BEEK et al., 2013). Posteriormente esta cepa foi detectada em vários outros países como nos Estados Unidos (BARCLAY et al., 2013), na Bélgica (FONAGER et al., 2013), na Dinamarca (FONAGER et al., 2013), na Itália (GIAMMANCO et al., 2013), Bangladesh (RAHMAN et al., 2013), Suíça (HUTTNER et al., 2013), China (JI et al., 2013; SHEN et al., 2013) e no Brasil (SILVA et al., 2013).

De acordo com um relatório dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), mais da metade dos surtos de NoV relatados entre setembro e dezembro de 2012 nos Estados Unidos foram causadas por GII.4 Sydney, estabelecendo assim a substituição oficial da variante GII.4, previamente denominada New Orleans (BARCLAY et al., 2013).

2.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A rápida detecção do NoV é essencial para a implementação de medidas que visam a redução da disseminação das infecções gastrointestinais causadas por este vírus (BRUINS et al., 2010; GEGINAT et al., 2012; AMBERT-BALAY; POTHIER, 2013).

Desde a primeira identificação das partículas virais do NoV, por microscopia eletrônica (GREEN et al., 1995; WIDDOWSON et al., 2005; BORGES et al., 2006), alguns métodos para a detecção do vírus em amostras fecais vem sendo desenvolvidos, como os testes imunoenzimáticos (testes de imunoabsorbância ligado à enzima (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*) e testes imunocromatográficos de fluxo lateral) e a reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR).

A microscopia eletrônica e a imunomicroscopia eletrônica permitem detectar partículas de NoV em fezes. Entretanto, estas metodologias apresentam limitações como a baixa sensibilidade, pois exigem altas concentrações virais ($10^5 - 10^6$ partículas/mL) para visualização, podendo ser confundidos com outros calicivírus devido às semelhanças morfológicas e também exigem equipamentos específicos, que ainda não são acessíveis para grande parte dos pesquisadores (KOOPMANS et al., 2002; GREEN, 2007).

Os testes imunoenzimáticos para a detecção do NoV começaram a ser desenvolvidos a partir de uma pesquisa realizada por Jiang e colaboradores (1992), quando estabeleceram um sistema para a expressão das proteínas do capsídeo do NoV em baculovírus, permitindo assim a obtenção do antígeno viral (JIANG et al., 1992).

Estes testes proporcionam um diagnóstico rápido e de fácil execução, não necessitam de equipamentos sofisticados e processam várias amostras ao mesmo tempo (BRUIN et al., 2006; KHAMRIN et al., 2008; MORILLO et al., 2011), o que permite uma rápida detecção de noroviroses, possibilitando a redução da rápida propagação de infecções gastrointestinais (POMBUBPA; KITTIGUL, 2012; AMBERT-BALAY; POTHIER, 2013). Entretanto, ainda há poucos relatos na literatura quanto à eficácia destes métodos (BRUGGINK et al., 2011).

As técnicas de biologia molecular são consideradas padrão ouro no diagnóstico e caracterização de agentes virais (HALL et al., 2011), sendo o RT-PCR um dos métodos utilizados em todo o mundo. O seu desenvolvimento na década de 90, proporcionou um meio de diagnóstico para a detecção de infecções por NoV (WIDDOWSON et al., 2005). Embora este método seja considerado o mais sensível e específico para o diagnóstico deste vírus, ele é um meio de diagnóstico caro, exige pessoal treinado e equipamentos especializados (KHAMRIN et al., 2008; KIRBY et al., 2010).

A detecção e caracterização do NoV, através do RT-PCR, são realizadas com a utilização de iniciadores, que podem ser desenhados a partir de diferentes regiões do genoma viral (ORFs 1, 2 e 3), denominadas: (a) região A, onde está localizado o gene RdRp na ORF1, (b) região B, localizada na extremidade 3' da ORF1, (c) região C, pequena região localizada próxima à extremidade 5' da ORF2, (d) região D, localizada na região 3' da ORF2 (ANDO et al., 2000; VINJÉ et al., 2004) (**Figura 09**). Dentre esses, os iniciadores desenhados a partir da região A são amplamente utilizados por esta região ser considerada altamente conservada (VINJÉ et al., 2003).

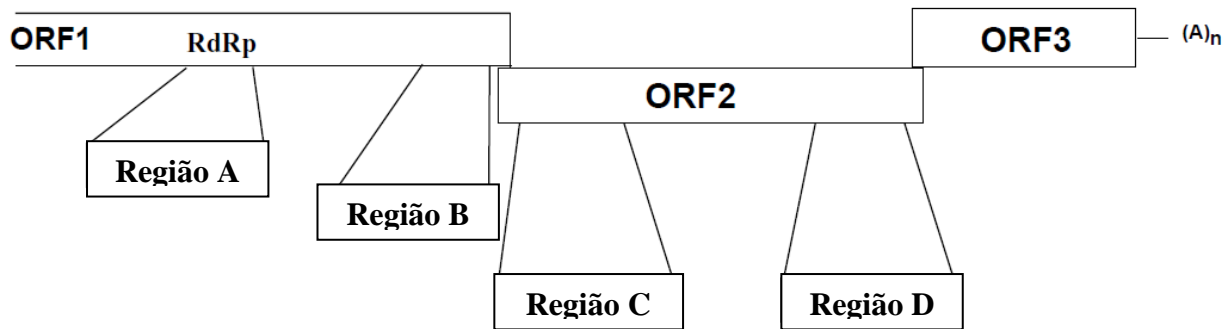


Figura 09. Representação esquemática das regiões utilizadas para o desenho dos iniciadores. Regiões A, B, C e D (Adaptado de VINJÉ et al., 2004).

As sequências gênicas das cepas de NoV, obtidas por pesquisadores do mundo todo, são depositadas em banco de dados disponíveis na internet, como o GenBank, Noronet e CaliciNet. O GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) é um banco de dados do *National Institutes of Health* (NIH), onde contém sequências gênicas de vários organismos, com colaboração internacional do banco de dados de DNA do Japão (DDBJ) e do Laboratório Europeu de Biologia Molecular (EMBL). O NoroNet (<http://www.rivm.nl/en/Topics/N/NoroNet>) é uma continuação da rede *Foodborne Viruses in Europe* (FBVE), que compreende virologistas e epidemiologistas de 13 países europeus desde 1999. Esse banco de dados compartilha informações de pesquisas sobre vírus entéricos, principalmente sobre o NoV. O CaliciNet (www.caliciNet@cdc.gov) é um banco de dados desenvolvido pelo CDC em 2009, que compreende uma rede de laboratórios de saúde pública e de regulamentação dos alimentos, os quais depositam sequências gênicas do NoV, identificadas a partir de surtos.

As informações contidas nestes bancos de dados podem ser utilizadas para associar surtos e identificar novas cepas circulantes em todo o mundo.

2.8 PREVENÇÃO, CONTROLE E TRATAMENTO

As classificações de risco dos agentes biológicos diferem entre os países, em virtude de fatores regionais específicos que podem influenciar na sobrevivência do agente biológico e no seu potencial endêmico (MS, 2006).

Nos Estados Unidos, o *Center for Disease Control* (CDC) classifica estes agentes em três categorias A, B e C. Baseado nesta classificação, o NoV é incluído na categoria B devido a sua alta infectividade, extrema estabilidade no ambiente, resistência aos desinfetantes comuns e por causar doença incapacitante (KARST, 2010; HALL et al., 2011).

No Brasil, os agentes biológicos são classificados em classe de risco 1, 2, 3 e 4, com base em diversos aspectos, tais como: virulência, modo de transmissão, estabilidade do agente, concentração e volume, origem do material potencialmente infeccioso, disponibilidade de medidas profiláticas eficazes, disponibilidade de tratamento eficaz, dose infectante, tipo de ensaio e fatores referentes ao trabalhador (MS, 2006). De acordo com esta classificação, o NoV é classificado na classe de risco 2, por apresentar risco individual moderado e limitado risco para a comunidade. Nesta classificação estão incluídos os agentes biológicos que provocam infecções no homem ou animais, cujo potencial de propagação na comunidade e de disseminação no meio ambiente é limitado, e para os quais existem medidas terapêuticas e profiláticas eficazes (MS, 2006).

O período de incubação do NoV é muito curto e ele é considerado um vírus altamente infeccioso. Assim, a interrupção da transmissão é a primeira estratégia para a prevenção

(WILHELMI et al., 2003), que inclui a higienização frequente das mãos com água e sabão, seguida ou não da utilização de antissépticos (HALL et al., 2011).

Uma vez no ambiente, o NoV pode permanecer infeccioso por um longo período de tempo em superfícies inanimadas, a depender dos procedimentos de limpeza e desinfecção utilizados. Alguns estudos relatam que eles podem permanecer de 8 horas a 12 dias em superfícies contaminadas (CLAY et al., 2006; KOOPMANS, 2009).

A desinfecção das superfícies pode ser realizada com o uso de diferentes soluções, como: hipoclorito de sódio a 2%, hipoclorito de sódio/detergente, vapor de álcool não inflamável em sistemas de CO₂, vapor de cloro e outros compostos cáusticos, compostos com ozônio e peróxido de hidrogênio (PARASHAR et al., 2001; WILHELMI et al., 2003; BARKER et al., 2004; HALL et al., 2011). Porém, a utilização de detergentes dissociado do hipoclorito de sódio e desinfetantes de uso comum, incluindo álcool e amônio quaternário é ineficiente na eliminação da contaminação do NoV (BARKER et al., 2004; DUIZER et al., 2004; ESTES et al., 2006).

Apesar da possível utilização das diversas medidas profiláticas descritas acima, ainda é observado o aumento dos casos de infecções por NoV, o que tem motivado o desenvolvimento de vacinas (WILHELMI et al., 2003; BARTSCH et al., 2012). Até o momento as vacinas contra o NoV ainda estão em fase de desenvolvimento e várias questões fundamentais ainda precisam ser esclarecidas, como: a duração da imunidade, o conhecimento específico dos receptores de ligação, o grau de reatividade cruzada entre os diversos tipos de NoV, o desempenho em grupos de alto risco (principalmente crianças e idosos) e se a proteção é proporcionada para todos os tipos de infecções, incluindo aqueles assintomáticos (ESTES et al., 2000; DONALDSON et al., 2008; HALL, 2012).

Estudos pré-clínicos para o desenvolvimento da vacina contra o NoV têm utilizado as VLPs, partículas que imitam a estrutura e propriedades antigênicas destes vírus. Estas partículas são construídas com proteínas do capsídeo VP1, não são replicáveis e não possuem genoma viral (ATMAR; ESTES, 2012; TAMMINEN et al., 2013).

Em um estudo clínico desenvolvido para avaliar a eficácia da vacina com VLPs por via intranasal, foi demonstrada a possibilidade de prevenir a infecção por NoV através da vacinação. Entretanto, a proteção observada foi homotípica, pois as cepas eram do mesmo genogrupo (ATMAR et al., 2011).

Assim, tem sido sugerido o desenvolvimento de uma vacina contra o NoV com a combinação de pelo menos dois genótipos, sendo um genótipo pertencente a cada um dos principais genogrupos (TAMMINEN et al., 2013).

Atualmente, foi desenvolvido um estudo em ratos, utilizando uma vacina trivalente, que consiste em NoV VLPs (GI.3 e GII.4) e Rotavírus recombinante (rVP6), administrada intramuscularmente. Neste estudo, a vacina induziu respostas imunes mais potentes quando comparadas às VLPs sozinhas, sugerindo uma proteção para a grande maioria dos genótipos circulantes de NoV e Rotavírus (TAMMINEN et al., 2013).

Em humanos, foi conduzido um estudo utilizando uma vacina com VLPs, bivalente (GI.1 e GII.4) associada a adjuvante, por via intramuscular e, foi observada a proteção dos indivíduos adultos e redução dos sinais como vômitos e/ou diarreias (BERNSTEIN et al., 2013).

A empresa farmacêutica Takeda anunciou, em outubro de 2013, os resultados de um estudo na fase 1/2 da vacina bivalente contra o NoV, utilizando VLPs (GI e GII), por via intramuscular em voluntários adultos saudáveis. O estudo demonstrou que houve um impacto clinicamente relevante sobre a incidência da doença e redução da excreção viral nas fezes (TAKEDA, 2013).

Além dos estudos para o desenvolvimento de candidatas vacinas contra o NoV, pesquisas com drogas antivirais têm sido desenvolvidas contra as gastroenterites causadas por estes vírus.

Em 2007 foi desenvolvido um estudo que permitiu elaborar uma biblioteca de compostos com capacidade de inibir a ligação do NoV aos receptores HGBA, utilizando antígenos salivares (FENG; JIANG, 2007). Neste mesmo ano, pesquisadores relataram, pela primeira vez, que a associação de IFN- γ e ribavirina poderia ser utilizada como opção terapêutica para o tratamento da gastroenterite causada pelo NoV (CHANG; GEORGE, 2007).

Entretanto, até o momento, o tratamento das infecções por NoV ainda consiste apenas em medidas profiláticas, como nas gastroenterites causadas por outros agentes etiológicos. Nos casos de gastroenterites leves, é recomendada a utilização de fluidos e eletrólitos para a re-hidratação oral e, nos casos mais graves, a administração intravenosa de soro fisiológico (GLASS et al., 2009).

Por isto, é de fundamental importância o desenvolvimento de estudos e pesquisas que visem o aprimoramento de medidas preventivas e terapêuticas na abordagem das infecções por NoV.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar e caracterizar molecularmente o Norovírus humano (NoV) em amostras de fezes de pacientes atendidos com quadro de gastroenterite aguda, no serviço de emergência de um hospital particular, na cidade de Salvador, Bahia, Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a presença de antígeno do NoV nas fezes de crianças com quadro de gastroenterite aguda;
- Caracterizar os quadros gastroentéricos decorrentes da infecção por NoV;
- Avaliar a eficácia dos testes imunoenzimáticos utilizados no diagnóstico de infecção causada por NoV;
- Caracterizar molecularmente as cepas de NoV circulantes em Salvador.

4 REFERÊNCIAS

AHMED, S. M.; LOPMAN, B. A.; LEVY, K. A systematic review and meta-analysis of the global seasonality of norovirus. *PLoS ONE*, v.8, p.e75922, 2013.

AMBERT-BALAY, K.; POTHIER, P. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for detection of norovirus in faecal samples. *J. Clin. Virol.*, v.56, p.278-282, 2013.

ANDO, T.; NOEL, J. S.; FANKHAUSER, R. L. Genetic classification of “Norwalk-like viruses”. *J. Infect. Dis.*, v.181 (suppl 2), p.S336-48, 2000.

ARAGÃO, G. C.; MASCARENHAS, J. D. P.; KAIANO, J. H. L.; LUCENA, M. S. S.; SIQUEIRA, J. A. M.; FUMINAN, T. M.; HERNANDEZ, J. M.; OLIVEIRA, C. S.; OLIVEIRA, D. S.; ARAÚJO, E. C.; SOARES, L. S.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. Norovirus diversity in diarrheic children from an African-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. *PLoS ONE*, v.8, p.e56608, 2013.

ATMAR, R. L. Noroviruses: state of the art. *Food Environ. Virol.*, v.2, p.117-26, 2010.

ATMAR, R. L.; BERNSTEIN, D. I.; HARRO, C. D.; AL-IBRAHIM, M. S.; CHEN, W. H.; FERREIRA, J.; ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y.; OPEKUN, A. R.; RICHARDSON, C.; MENDELMAN, P. M. Norovirus against experimental human Norwalk virus illness. *N. Engl. J. Med.*, v.365, p.2178-2187, 2011.

ATMAR, R. L.; ESTES, M. K. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol. Clin. N. Am.*, v.35, p.275-290, 2006.

ATMAR, R. L.; ESTES, M. K. Norovirus vaccine development: next steps. *Expert. Rev. Vaccines*, v.11, p.1023-1025, 2012.

ASANAKA, M.; ATMAR, R. L.; RUVOLO, V.; CRAWFORD, S. E.; NEILL, F. H.; ESTES, M. K. Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *PNAS*, v.102, p.10327-10332, 2005.

BALL, L. A. Virus replication strategies. In: Knipe DM, Howley PM, *Fields Virology*, ed.5, Lippincott Williams & Wilkins, p.119-140, 2007.

BARCLAY, L.; WIKSWO, M.; GREGORICUS, N.; VINJÉ, J.; LOPMAN, B.; PARASHAR, U.; HALL, A.; LESHEM, E. Emergence of new norovirus strain GII.4 Sydney – United States. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.62, p.55, 2013.

BARKER, J.; VIPOND, I. B.; BLOOMFIELD, S. F. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environment surfaces. *J. Hosp. Infect.*, v.58, p.42-49, 2004.

BARTSCH, S. M.; LOPMAN, B. A.; HALL, A. J.; PARASHAR, U. D.; LEE, B. Y. The potential economic value of a human vaccine for the United States. *Vaccine*, v.30, p.7097-7104, 2012.

BERNSTEIN, D. I.; ATMAR, R. L.; LYON, M.; TREANOR, J. J.; CHEN, W. H.; FRENCK, R.; JIANG, X.; VINJÉ, J.; AL-IBRAHIM, M. S.; BARRETT, J.; GRAHAM, D. Y.; RICHARDSON, C.; GOODWIN, R.; BORKOWSKI, A.; CLEMENS, R.; MENDELMAN, P. M. An intramuscular bivalent norovirus GI.1/GII.4 virus like particle vaccine protects against vomiting and diarrhea in an experimental GII.4 oral challenge study. [Abstract]. IDWeek 2013, San Francisco, CA, Oct.2-6, 2013. Disponível em: <https://idsa.confex.com/idsa/2013/webprogram/Paper43007.html> Acesso em: 05 de dezembro de 2013.

BELLIOT, G.; SOSNOVTSEV, S. V.; MITRA, T.; HAMMER, C.; GARFIELD, M; GREEN, K. Y. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J. Virol.*, v.77, p.10957-74, 2003.

BERTOLOTTI-CIARLET, A.; CRAWFORD, S. E.; HUTSON, A. M.; ESTES, M. K. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J. Virol.*, v.77, p.11603-15, 2003.

BERTOLOTTI-CIARLET, A.; WHITE, L. J.; CHEN, R.; PRASAD, B. V. V.; ESTES, M. K. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J. Virol.*, v.76, p.4044-55, 2002.

- BORGES, A. M. T.; TEIXEIRA, J. M. S.; COSTA, P. S. S.; GIUGLIANO, L. G.; FIACCADORI, F. S.; CARVALHO E FRANCO, R.; BRITO, W. M. E.; LEITE, J. P. G.; CARDOSO, D. D.P. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p.721-724, 2006.
- BOTELHO-NEVERS, E.; GAUTRET, P. Outbreaks associated to large open air festivals, including music festivals, 1980 to 2012. *Euro. Surveill.*, v.18, p.20426, 2013.
- BRUGGINK, L. D.; WITLOX, K. J.; SAMEER, R.; CATTON, M. G.; MARSHALL, J. A. Evaluation of the RIDA[®] QUICK immunochromatographic norovirus detection assay using specimens from Australian gastroenteritis incidents. *J. Virol. Methods.*, v.173, p.121-126, 2011.
- BRUIN, E.; DUIZER, E.; VENNEMA, H.; KOOPMANS, M. P. G. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J. Virol. Methods.*, v.137, p.259-264, 2006.
- BRUINS, M. J.; WOLFHAGEN, M. J.; SCHIRM, J.; RUIJS, G. J. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of norovirus in stool samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.29, p.741-743, 2010.
- BULL, R. A.; TU, E. T. V.; McIVER, C. J.; RAWLINSON, W. D.; WHITE, P. A. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, p.327-333, 2006.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention. “Norwalk-like viruses”. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*, v.50 (RR09), p.1-18, 2001.
- CHANG, K. O.; GEORGE, D. W. Interferons and ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replicon-bearing cells. *J. Virol.*, v.81, p.12111-12118, 2007.
- CHEN, S-Y.; TSAI, C-N.; LAI, M-W.; CHEN, C-Y.; LIN, K-L.; LIN, T-Y.; CHIU, C-H. Norovirus infection as a cause of diarrhea – associated benign infantile seizures. *Clin. Infect. Dis.*, v.48, p.849-855, 2009.
- CLARKE, I. N.; LAMB DEN, P. R. The molecular biology of caliciviruses. *J. Gen. Virol.*, v.78, p.291-301, 1997.

CLAY, S.; MAHERCHANDANI, S.; MALIK, Y. S.; GOYAL, S. M. Survival on uncommon fomites of feline calicivirus, a surrogate of noroviruses. *Am. J. Infect. Control.*, v.34, p.41-43, 2006.

DONALDSON, E. F.; LINDESMITH, L. C.; LoBUE, A. D.; BARIC, R. S. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol. Reviews*, v.225, p.190-211, 2008.

DONALDSON, E. F.; LINDESMITH, L. C.; LoBUE, A. D.; BARIC, R. S. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.8, p.231-241, 2010.

DUIZER, E.; BIJKERK, P.; ROCKX, B.; DE GROOT, A.; TWISK, F.; KOOPMANS, M. Inactivation of Caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.70, p.4538-4543, 2004.

EDEN, J-S.; TANAKA, M. M.; BONI, M. F.; RAWLINSON, W. D.; WHITE, P. A. Recombination within the pandemic Norovirus GII.4 lineage. *J. Virol.*, v.87, p.6270-6282, 2013.

ESTES, M. K.; BALL, J. M.; GUERRERO, R. A.; OPEKUN, A. R.; GILGER, M. A.; PACHECO, S. S.; GRAHAM, D. Y. Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J. Infect. Dis.*, v.181, p.S367-373, 2000.

ESTES, M. K.; PRASAD, B. V. V.; ATMAR, R. L. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v.19, p.467-474, 2006.

ETTAYEBI, K.; 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. *J. Virol.*, v.77, p.11790-11797, 2003.

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

FENG, X.; JIANG, X. Library screen for inhibitors targeting Norovirus binding to histo-blood group antigen receptors. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.51, p.324-331, 2007.

FERNANDEZ-VEGA, V.; SOSNOVTSEV, S. V.; BELLLOT, G.; KING, A. D.; MITRA, T.; GORBALENYA, A.; GREEN, K. Y. Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J. Virol.*, v.78, p.4827-4837, 2004.

FERREIRA, M. S. R.; GARCIA, R. C. C.; XAVIER, M. P. T. P.; RIBEIRO, R. L.; ASSIS, R. M.; MOTA, M. C. M. S.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; OLIVEIRA, S. A. Genotyping of gastroenteric viruses in hospitalised children: first report of norovirus GII.21 in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.107, p.1064-1067, 2012.

FONAGER, J.; HINDBAEKS, L. S.; FISCHER, T. K. Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012. *Euro. Surveill.*, v.18, p.20413, 2013.

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

EGINAT, G.; KAISER, D.; SCHREMPF, S. Evaluation of third-generation ELISA and rapid immunochromatographic assay for the detection of norovirus infection in fecal samples from inpatients of a German tertiary care hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.31, p.733-737, 2012.

GIAMMANCO, G. M.; De GRAZIAM S.; TUMMOLO, F.; BONURA, F.; CALDERARO, A.; BUONAVOGLIA, A.; MARTELLA, V.; MEDICI, M. C. Norovirus GII.4/Sydney/2012 in Italy, winter 2012-2013. *Emerg. Infect. Dis.*, v.19, p.1348-1349, 2013.

GLASS, R. I.; NOEL, J. ANDO, T.; FRANKHAUSE, R.; BELLLOT, G.; MOUNTS, A.; PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; MONROE, S. S. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J. Infect. Dis.*, Suppl 2, p.S254-261, 2000.

GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D.; ESTES, M. K. Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.*, v.361, p.1776-85, 2009.

GOODFELLOW, I.; CHAUDHRY, Y.; GIOLDASI, I.; GERONDOPOULOS, A.; NATONI, A.; LABRIE, L.; LALIBERTÉ, J-F.; ROBERTS, L.; Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Reports*, v.6, p.968-972, 2005.

GREEN J.; GALLIMORE, C. I.; NORCOTT, J. P.; LEWIS, D.; BROWN, D. W. G. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV – associated gastroenteritis. *J. Med. Virol.*, v. 47, p. 392-398, 1995.

GREEN, K. Y. *Caliciviridae: The Noroviruses*. In: Knipe DM, Howley PM, *Fields Virology*, ed.5, Lippincott Williams & Wilkins, p.949-980, 2007.

GREEN, K. Y.; ANDO, T.; BALAYAN, M. S.; BERKE, T.; CLARKE, I. N.; ESTES, M. K.; MATSON, D. O.; NAKATA, S.; NEILL, J. D.; STUDDERT, M. J.; THIEL, H-J. Taxonomy of the Caliviruses. *J. Infect. Dis.*, v.181 (Suppl2), p.S322-30, 2000.

GUIX, S.; ASANAKA, M.; KATAYAMA, K.; CRAWFORD, S. E.; NEILL, F. H.; ATMAR, R. L.; ESTES, M. K. Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J. Virol.*, v.81, p.12238-12248, 2007.

HALL, A. J. Noroviruses: The perfect human pathogens? *J. Infect. Dis.*, v.205, p.1622-1624, 2012.

HALL, A. J.; VINJÉ, J.; LOPMAN, B.; PARK, G. W.; YEN, C.; GREGORICUS, N.; PARASHAR, U. Updated Norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.60, 20p., 2011.

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

HASING, M. E.; LEE, B. E.; PREIKSAITIS, J. K.; TELLIER, R.; HONISH, L.; SENTHILSELVAN, A.; PANG, X. L. Emergence of a new norovirus GII.4 variant and changes in the historical biennial pattern of norovirus outbreak activity in Alberta, Canada, from 2008 to 2013. *J. Clin. Microbiol.*, v.51, p.2204-2211, 2013.

HUANG, P.; FARKAS, T.; ZHONG, W.; TAN, M.; THORNTON, S.; MORROW, A. L.; JIANG, X. 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. *J. Virol.*, v.79, p.6714-6722, 2005.

HUTSON, A. M.; ATMAR, R. L.; ESTES, M. K. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *TRENDS in Microbiology*, v.12, p.279-287, 2004.

HUTTNER, B.; CORDEY, S.; SAUVAN, V.; PAGANI, L.; ITEN, A.; KAISER, L.; RENY, J-L.; HARBARTH, S. An outbreak of norovirus strain GII.4 Sydney in a geriatric teaching hospital. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, v2, Suppl1, p.73, 2013.

JI, L.; WU, X.; YAO, W.; CHEN, L.; XU, D.; AHEN, Y.; SHEN, J.; HAN, J. Rapid emergence of novel GII.4 sub-lineages noroviruses associated with outbreaks in Huzhou, China, 2008-2012. *PLoS ONE*, v.8, p.e82627, 2013.

JIANG, X.; WANG, M.; GRAHAM, D. Y.; ESTES, M. K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.*, v.66, p.6527-6532, 1992.

JIANG, X.; WANG, M.; WANG, K.; ESTES, M. K. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology*, v.195, p.51-61, 1993.

KAPIKIAN, A. Z. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J. Infect. Dis.*, v.181 (Suppl 2), p.S295-302, 2000.

KARST, S. M. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses*, v.2, p.748-81, 2010.

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

KIRBY, A.; GURGEL, R. Q.; DOVE, W.; VIEIRA, S. C.; CUNLIFFE, N. A.; CUEVAS, L. E. An evaluation of the RIDASCREEN and IDEIA enzyme immunoassays and the RIDAQUICK immunochromatographic test for the detection of norovirus in faecal specimens. *J. Clin. Virol.*, v.49, p.254-257, 2010.

KOOPMANS, M.; VON BONSDORFF, C-H.; VINJÉ, J.; DE MEDICI, D.; MONROE, S. Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, v.100, p.107-114, 2002.

KOOPMANS, M. Noroviruses in healthcare settings: a challenging problem. *J. Hosp. Infect.*, v.73, p.331-337, 2009.

KRONEMAN, A.; VEGA, E.; VENNEMA, H.; VINJÉ, J.; WHITE, P. A.; HANSMAN, G.; GREEN, K.; MARTELLA, V.; KATAYAMA, K.; KOOPMANS, M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.*, v.158, p.2059-68, 2013.

KRONEMAN, A.; VENNEMA, H.; HARRIS, J.; REUTER, G.; VON BONSDORFF, C-H.; HEDLUND, K-O.; VAINIO, K.; JACKSON, V.; POTHIER, P.; KOCH, J.; SCHREIER, E.; BÖTTIGER, B.; KOOPMANS, M. *Eurosurveillance*, v.11, issue 50, 14 de dezembro de 2006. Disponível em <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3093>> Acesso em: 12 de dezembro de 2013.

LEVETT, P. N.; GU, M.; LUAN, B.; FEARON, M.; STUBBERFIELD, J.; JAMIESON, F.; PETRIC, M. Longitudinal study of molecular epidemiology of small round- Structured Viruses in a Pediatric Population. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, p.1497-1501, 1996.

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

LI, J.; PREDMORE, A.; DIVERS, E.; LOU, F. New interventions against human Norovirus: progress, opportunities, and challenges. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, v.3, p.331-352, 2012.

LIU, L-J.; LIU, W.; LIU, Y-X.; XIAO, H-J.; JIA, N.; LIU, G.; TONG, Y-G.; CAO, W-C. Identification of norovirus as the top enteric viruses detected in adult cases with acute gastroenteritis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.82, p.717-722, 2010.

LOOPMAN, B. A.; BROWN, D. W.; KOOPMANS, M. Human caliciviruses in Europe. *J. Clin. Virol.*, v.24, p.137-160, 2002.

MARIONNEAU, S.; CAILEAU-THOMAS, A.; ROCHER, J.; Le MOULLAC-VAIDYE, B.; RUVOËN, N.; CLÉMENT, M.; Le PENDU, J. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie*, v.83, p.565-573, 2001.

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

MARSHALL, J. A.; HELLARD, M. E.; SINCLAIR, M. I.; FAIRLEY, C. K.; COX, B. J.; CATTON, M. G.; KELLY, H.; WRIGTH, P. J. Incidence and characteristics of endemic Norwalk-like viruses-associated gastroenteritis. *J. Med. Virol.*, v.69, p.568-578, 2003.

MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; DECARO, N.; ELIA, G.; RADOGNA, A.; D'ABRAMO, M.; DESARIO, C.; CAVALLI, A.; CORRENTE, M.; CAMERO, M.; GERMINARIO, C. A.; BÁNYAI, K.; DI MARTINO, B.; MARSILIO, F.; CARMICHAEL, L. E.; BUINAVOGLIA, C. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg. Infect. Dis.*, v.14, p.1306-1308, 2008.

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

MESQUITA, J. R.; BARCLAY, L.; NASCIMENTO, M. S. J.; VINJÉ, J. Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.*, v.16, p980-982, 2010.

MLANDEVOZA, Z.; KORSUN, N.; GEONOVA, T.; Di BARTOLO, I.; FIORE, L.; RUGGERI, F. M. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses detected in outbreak and sporadic cases of acute gastroenteritis in Bulgaria. *J. Med. Virol.*, n.80, p.2161-2168, 2008.

MORILLO, S. G.; CILLI, A.; CARMONA, R. C. C.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Identification and molecular characterization of Norovirus in São Paulo state, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.39, p.619-322, 2008.

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

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. Classificação de risco dos agentes biológicos. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 36p., 2006.

MURAKAMI, K.; KURIHARA, C.; OKA, T.; SHIMOIKE, T.; FUJII, Y.; TAKAI-TODAKA, R.; PARK, Y.; MATSUDA, T.; HOKARI, R.; MIURA, S.; KATAYAMA, K. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLoSOne*, v.8, issue 6, e66534, 2013.

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

OKITSU-NEGISHI, S.; NGUYEN, T. A.; PHAN, T. G.; USHIMA, H. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. *Pediatr. Int.*, v.46, p.245-252, 2004.

PARASHAR, U. D.; QUIROZ, E. S.; MOUNTS, A. W.; MONROE, S. S.; FRANKHAUSER, R. L.; ANDO, T.; NOEL, J. S.; BULENS, S. N.; BEARD, S. R. LI, J. F.; BRESEE, J. S.; GLASS, R. I. “Norwalk-like viruses”. Public health consequences and outbreak management. *MMWR Recomm. Rep.*, v.50, p.1-17, 2001.

PARKS, C. G.; MOE, C. L.; RHODES, D.; LIMA, A.; BARRETT, L.; TSENG, F.; BARIC, R.; TALAL, A.; GUERRANT, R. Genomic diversity of “Norwalk like viruses” (NLVs): pediatric infections in a brazilian shantytown. *J. Med. Virol.*, v.58, p.426-434, 1999.

PATEL, M. M.; WIDDOWSON, M-A.; GLASS, R. I.; AKAZAWA, K.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.*, v.14, p.1224-1231, 2008.

POMBUBPA, K.; KITTIGUL, L. Assessment of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of norovirus gastroenteritis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.31, p.2379-2383, 2012.

PRASAD, B. V. V.; ROTHNAGEL, R.; JIANG, X.; ESTES, M. K. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J. Virol.*, v.68, p.5117-5125, 1994.

RABENAU, H. F.; STÜRMER, M.; BUXBAUM, S.; WALCZOK, A.; PREISER, W.; DOERR, H. W. Laboratory diagnosis of Norovirus: which method is the best? *Intervirology*, v.46, p.232-238, 2003.

RAHMAN, M.; NAHAR, S.; AFRAD, M. H.; FARUQUE, A. S. G.; AZIM, T. Norovirus variant GII.4/Sydney/2012, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.*, v.19, p.1347-1348, 2013.

RAMIREZ, S.; GIAMMANCO, G. M.; De GRAZIA, S.; COLOMBA, C.; MARTELLA, V.; ARISTA, S. Emerging GII.4 norovirus variants affect children with diarrhea in Palermo, Italy in 2006. *J. Med. Virol.*, v.81, p.139-145, 2009.

RIBEIRO, L. R.; GIUBERTI, R. S. O.; BARREIRA, D. M. P. G.; SAICK, K. W.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SPANO, L. C. Hospitalization due to norovirus genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.103, p.201-206, 2008.

ROHAYEM, J.; ROBEL, I.; JÄGER, K.; SCHEFFLER, U.; RUDOLPH, W. Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by Norovirus 3D^{pol}. *J. Virol.*, v.80, p.7060-7069, 2006.

SCIPIONI, A.; MAUROY, A.; VINJÉ, J. THIRY, E. Animal noroviruses. *Vet. J.*, v.178, p.32-45, 2008.

SESTAK, K.; FEEL, S.; FEY, B.; DUFOUR, J.; HARGITT, E.; ALVAREZ, X.; PAHAR, B.; GREGORICUS, N.; VINJE, J.; FARKAS, T. Experimental inoculation of juvenile rhesus macaques with primate enteric caliciviruses. *PLoS One*, v.7, p.e377973, 2012.

SHEN, Z.; QIAN, F.; LI, Y.; HU, Y.; YUAN, Z.; ZHANG, J. Novel norovirus GII.4 variant, Shanghai, China, 2012. *Emerg. Infect. Dis.*, v.19, p.1337-1339, 2013.

SIEBENGA, J. J.; VENNEMA, H.; ZHENG, D-P.; VINJÉ, J.; LEE, B. E.; PANG, X-L.; HO, E. C. M.; LIM, W.; CHOUDEKAR, A.; BROOR, S.; HALPERIN, T.; RASSOL, N. B. G.; HEWITT, J.; GREENING, G. E.; JIN, M.; DUAN, Z-J.; LUCERO, Y.; O'RYAN, M.; HOEHNE, M.; SCHREIER, E.; RATCLIFF, R. M.; WHITE, P. A.; IRITANI, N.; REUTER, G.; KOOPMANS, M. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J. Infect. Dis.*, v.200, p.802-812, 2009.

SILVA, L. D.; RODRIGUES, E. L.; LUCENA, M. S. S.; LIMA, I. C. G.; OLIVEIRA, D. S.; SOARES, L. S.; MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. Detection on the pandemic norovirus variant GII.4 Sydney 2012 in Rio Branco, state of Acre, northern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, p.1-2, 2013.

SMITS, S. L.; RAHMAN, M.; SCHAPENDONK, C. M. E.; VAN LEEUWEN, M.; FARUQUE, A. S. G.; HAAGMANS, B. L.; ENDTZ, H. P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Calicivirus from novel Recovirus genogroups in human diarrhea, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.*, v.18, p.1192-1195, 2012.

SOSNOVTSEV, S. V.; BELLLOT, G.; CHANG, K. O.; PRIKHODKO, V. G.; THACKRAY, L. B.; WOBUS, C. E.; KARST, S. M.; VIRGIN, H. W.; GREEN, K. Y. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J. Virol.*, v.80, p.7816-7831, 2006.

TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED. Takeda highlights data from clinical trial of investigational norovirus vaccine candidate. Disponível em: <http://www.takeda.com/news/files/20131007_en.pdf> Acesso em 10 de dezembro de 2013.

TAMMINEN, K.; LAPPALAINEN, S.; HUHTI, L.; VESIKARI, T.; BLAZEVIC, V. Trivalent combination vaccine induces broad heterologous immune responses to norovirus and rotavirus in mice. *PLoS One*, v.8, issue 7, e70409, 2013.

TAN, M.; JIANG, X. Norovirus-host interaction: implications for disease control and prevention. *Expert. Rev. Mol. Med.*, v.9, p.1-22, 2007.

TAN, M.; JIANG, X. Norovirus gastroenteritis, carbohydrate receptors, and animal models. *PLoS Pathogens*, v.6, p.e10000983, 2010.

TROEGER, H.; LODDENKEMPER, C.; SCHEIER, E.; EPPLE, H-J.; ZEITZ, M.; FROMM, M.; SCHULZKE, J-D. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut.*, v.58, p.1070-1077, 2009.

TU, E. T-V.; BULL, R. A.; GREENING, G. E.; HEWITT, J.; LYON, M. J.; MARSHALL, J. A.; McIVER, C. J.; RAWLINSON, W. D.; WHITE, P. A. Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of Norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. *Clin. Infect. Dis.*, v.46, p.413-420, 2008.

Van BEEK, J.; AMBERT-BALAY, K.; BOTTELDOORN, N.; EDEN, J. S.; FONAGER, J.; HEWITT, J.; IRITANI, N.; KRONEMAN, A.; VENNEMA, H.; VINJÉ, J.; WHITE, P. A.; KOOPMANS, M. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro. Surveill.*, v.18, p.20345, 2013.

VEGA, E.; BARCLAY, L.; GREGORICUS, N.; WILLIAMS, K.; LEE, D.; VINJÉ, J. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerg. Infect. Dis.*, v.17, p. 1389-1395, 2011.

VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LEITE, J. P.; MIAGOSTOVICH, M. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v.26, p.602-606, 2007.

VINJÉ, J.; HAMIDJAJA, R. A.; SOBSEY, M. D. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J. Virol. Methods*, v.116, p.109-117, 2004.

VINJÉ, J.; VENNEMA, H.; MAUNULA, L.; BONSDORFF, C. H. V.; HOEHNE, M.; SCHREIER, E. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, p.1423-33, 2003.

WIDDOWSON, M-A.; CRAMER, E. H.; HADLEY, L.; BRESEE, J. S.; BEARD, R. S.; BULENS, S. N.; CHARLES, M.; CHEGE, W.; ISAKBAEVA, E.; WRIGHT, J. G.; MINTZ, E.; FORNEY, D.; MASSEY, J.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of Norovirus – United States, 2002. *J. Infect. Dis.*, v.190, p.247-262, 2003.

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

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.9, p.247-262, 2003.

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

YEN, C.; WIKSWO, M. E.; LOPMAN, B. A.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U. D.; HALL, A. J. Impact of an emergent Norovirus variant in 2009 on Norovirus outbreak activity in the United States. *Clin. Infect. Dis.*, v.53, p.568-571, 2011.

YU, Y.; YAN, S.; LI, B.; PAN, Y.; WANG, Y. Genetic diversity and distribution of human norovirus in China (1999-2011). *BioMed Res. Int.*, doi: 10.1155/2014/196169, 2014.

ZAKIKHANY, K.; ALLEN, D. J.; BROWN, D.; ITURRIZA-GÓMARA, M. Molecular evolution of GII.4 Norovirus strains. *PLoSOne*, v.7, issue 7, e41625, 2012.

ZHENG, D-P.; ANDO, T.; FRAKHAUSER, R. L.; BEARD, R. S.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, v.346, p.312-323, 2006.

5 MANUSCRITO 1

DETECÇÃO DE NOROVÍRUS EM CRIANÇAS COM GASTROENTERITE AGUDA ASSISTIDAS EM UMA UNIDADE DE EMERGÊNCIA NA CIDADE DE SALVADOR

Fabiana Lopes de Paula^{1,2}; Sílvia Inês Sardi¹; Aryane Cruz Oliveira Pinho¹; Isabela Brandão Peixoto¹; Cláudio José de Freitas Brandão^{3,4}; Luciana Rodrigues Silva^{3,5}; Marcus Welby-Borges¹; Gúbio Soares Campos¹

¹ Laboratório de Virologia, Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia

² Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Santo Antônio de Jesus, Bahia

³ Hospital Aliança, Salvador, Bahia

⁴ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia

⁵ Centro de Estudos em Gastroenterologia e Hepatologia Pediátricas, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia

RESUMO

A gastroenterite aguda representa um importante problema de saúde pública no mundo, sendo responsável pela terceira causa mais comum de morbidade em crianças nos países em desenvolvimento e por cerca de um terço de todas as hospitalizações entre os menores de cinco anos. Ela está associada a agentes etiológicos de origem viral, sendo o Norovírus (NoV) considerado o principal causador de surtos de gastroenterite aguda não bacteriana em todo o mundo. Devido à importância epidemiológica desta virose, o objetivo desse estudo foi detectar a presença de Norovírus em amostras de fezes de crianças hospitalizadas com sintomas de diarreia, no período de março a junho de 2009 em Salvador, Bahia. O total de 233 amostras coletadas foram submetidas à detecção do NoV pelo teste imunoenzimático (ELISA). Do total das amostras analisadas, 60,08% (140/233) foram positivas no ELISA, com predominância para o sexo masculino e maior frequência da infecção em crianças na faixa de 13 a 24 meses de idade. Amostras positivas pelo teste ELISA foram submetidas ao teste RT-PCR e sequenciamento genético. Após a análise gênica, foi identificado um alto grau de identidade com a cepa GII.4. Nesse estudo, o NoV foi identificado como um importante agente etiológico da gastroenterite em crianças no período estudado, sendo a cepa GII.4 a possível responsável pelas infecções por NoV na cidade de Salvador.

Palavras-chaves: Norovírus; gastroenterite; ELISA; RT-PCR.

ABSTRACT

Acute gastroenteritis is an important public health problem worldwide, accounting for the third most common cause of morbidity in children in developing countries and about one-third of all hospitalizations among children less than five years of age. It is associated with etiological viral agents, of which Norovirus (NoV) is considered the main cause of outbreaks of acute non-bacterial gastroenteritis worldwide. Due to the epidemiological importance of this virus, the aim of this study was to detect the presence of NoV in stool samples from children hospitalized with symptoms of diarrhea, from March to June 2009 in Salvador, Bahia. A total of 233 samples were subjected to an enzyme linked immune sorbent assay (ELISA) for the detection of NoV. Of the total samples, 60.08% (140/233) were positive to ELISA, with predominance of male gender and higher frequency of infection in children between 13-24 months of age. Samples positive by ELISA were subjected to RT-PCR and gene sequencing. After genetic analysis, a high degree of identity with the GII.4 strain was identified. In this study, NoV was identified as an important etiologic agent of gastroenteritis in children in the period studied, considering GII.4 strain as possible responsible for the NoV infections in Salvador.

Key-words: Norovirus; gastroenteritis; ELISA; RT-PCR.

INTRODUÇÃO

A gastroenterite é um problema de saúde pública mundial, que acomete anualmente em média de 700 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade (OKITSU-NEGISHI et al., 2004), sendo considerada como uma causa importante na mortalidade e morbidade pediátrica, observada principalmente em países em desenvolvimento. Sua etiologia é diversificada, podendo ser resultante da infecção por bactérias, parasitas e vírus (LI et al., 2012).

Os vírus que causam infecções gastrointestinais pertencem principalmente a quatro famílias distintas: calicivírus, rotavírus do grupo A, adenovírus e astrovírus (OKITSU-NEGISHI et al., 2004). Dentre os vírus que pertencem à família *Caliciviridae*, destaca-se o Norovírus (NoV), que está relacionado com infecções gastrointestinais esporádicas e, mais recentemente, identificado como agente causador da maioria dos surtos de gastroenterite aguda no mundo. Nos países em desenvolvimento, a infecção por este vírus em crianças resulta, em média, 1.100.000 hospitalizações e 218.000 mortes a cada ano (PATEL et al., 2009).

O NoV é um vírus icosaédrico, não envelopado, possui uma fita positiva de genoma de RNA de 7,5 a 7,7Kb, com 27 a 35nm de diâmetro e apresenta grande diversidade genética. Sua classificação é baseada de acordo com suas variantes genéticas em 5 genogrupos (G), dos quais 3 (GI, GII e GIV) são conhecidos por causar infecções em humanos (ZHENG et al., 2006). Dentre estes, o genogrupo GII é considerado como o mais prevalente no mundo, sendo o genótipo 4 responsável por aproximadamente 80% de todas as infecções (DONALDSON et al., 2008).

A transmissão do vírus ocorre principalmente por contaminação de água e alimentos. Após o período de incubação, de 1 a 3 dias, as manifestações clínicas são caracterizadas por

episódios repetidos de diarreia aguda, que pode ter duração de 12 a 60 horas e está frequentemente associada com uma variedade de outros sintomas como vômitos, náuseas, febre, dores abdominais, dores de cabeça e mialgias (ATMAR; ESTES, 2006; KARST, 2010). Estes sintomas, quando persistentes, não só comprometem a qualidade de vida, como também contribuem para estabelecer um quadro de desidratação e suas complicações, além de comprometimento nutricional (PARKS et al., 1999), podendo inclusive determinar a morte do paciente. Apesar destes sintomas serem os mais encontrados nas infecções por NoV, têm sido relatados casos de convulsão em crianças, associados à estas infecções (CHEN et al. 2009).

O diagnóstico para NoV é baseado na detecção do vírus em amostras de fezes por microscopia eletrônica, métodos imunoenzimáticos (teste imunocromatográfico de fluxo lateral e teste de imunoabsorbância ligado à enzima – ELISA) ou reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) (BRUIN et al., 2006). Todos estes métodos de diagnósticos apresentam vantagens e desvantagens quanto ao seu uso. Entretanto, dentre eles, o RT-PCR tem se mostrado o mais sensível e específico, sendo, portanto, considerado como padrão ouro no diagnóstico de NoV (GEORGIADIS et al., 2010).

A relevância do NoV como causador de surtos de gastroenterite em crianças e adultos já está bem definida, principalmente em países desenvolvidos. Entretanto, poucos estudos identificam seu envolvimento na gastroenterite pediátrica nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (PARKS et al., 1999; ARAGÃO et al., 2009; XAVIER et al., 2009). Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar e genotipificar o agente etiológico em fezes de crianças com quadros de gastroenterites agudas atendidas em uma unidade de emergência na cidade de Salvador, Bahia, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Salvador (UNIFACS), sob protocolo número 04.11.12.

Foram coletadas 233 amostras de fezes de crianças menores de 5 anos de idade, atendidas com gastroenterite aguda, no Hospital Aliança, na cidade de Salvador, durante o período de março a junho de 2009, as quais foram armazenadas a -70°C . As amostras foram analisadas por teste imunoenzimático – ELISA (Ridascreen[®] Norovirus 3^a geração, R-Biopharm, Alemanha), utilizando os procedimentos de acordo com o fabricante. Dentre as 140 amostras positivas para ELISA, foram selecionadas 47 amostras aleatoriamente, para a detecção do gene NoV RNA polimerase, pela técnica de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR). O RNA viral foi extraído diretamente das amostras de fezes, pela técnica de coluna, com a utilização do Kit QIAmp viral RNA mini Kit (QIAGEN, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído (8 μL) foi submetido à transcrição reversa (RT), juntamente com o par de *primers* CAL-32 (5'-ATGAATATGAATGAGGATGG-3') (SCHREIER et al., 2000) e MO3-N (5'-TCAGATGGGTCTTCATGATTGG-3') (KOEK et al., 2006), utilizando o Kit M-MLV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen, USA), seguindo o protocolo do fabricante e, posteriormente, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR). Assim, o cDNA obtido na RT foi amplificado com os *primers* JV-12 (5'-ATACCACTATGATGCAGATTA-3') (VINJÉ; KOOPMANS, 1996) e ACAL-36 (5'-GACAAAACAGAAGGACCAAT-3') (SCHREIER et al., 2000), os quais foram sintetizados pela Invitrogen Life Technologies, com a utilização do Kit Platinum Taq-DNA polimerase (Invitrogen, USA), seguindo as instruções do fabricante. O volume final da reação foi de 50 μL e as amplificações foram realizadas no

termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), sob as seguintes condições de amplificação: 94 °C/3 min, seguido de 30 ciclos de 93 °C/30 seg, 37 °C/15 seg, 72°C/30 seg e uma fase final de extensão de 72°C/5 min (KOEK et al., 2006). O amplicon gerado de aproximadamente de 428pb foi analisado após uma corrida eletroforética em gel de agarose a 2% e, posteriormente, foi realizada a purificação utilizando-se o Kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Alemanha), segundo as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado em 28 das amostras positivas, utilizando o Kit Big Dye Terminator® v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA). As sequências nucleotídicas obtidas foram depositadas no banco de dados GenBank do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*), sob os números de acessos KF307752, KF307753, KF307754 e, posteriormente, foram analisadas através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) oferecido pelo NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A gastroenterite em crianças é um problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, sendo considerada uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade mundial (PATEL et al., 2008). Embora tenha sido observada uma elevada morbidade durante o estudo, não foi constatado nenhum óbito.

Atualmente, os testes mais utilizados para o diagnóstico desta infecção são o teste imunoenzimático (ELISA) e a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR), os quais foram utilizados para a detecção do NoV neste estudo. A escolha do teste ELISA como primeira opção, foi decorrente da sua facilidade na execução e na possibilidade de rastreamento de grande número de amostras (BRUIN et al., 2006; BUCARDO et al., 2008). Das 233 amostras analisadas por este teste, 140 apresentaram resultado positivo para a presença de NoV (60,08% dos casos) (Figura 01), o que caracteriza um percentual de infecção por NoV acima dos índices relatados em outros estados do Brasil em anos anteriores, como em São Paulo entre os anos de 1995 a 1999 (33,3%) (CASTILHO et al., 2006), no Rio de Janeiro em 1997 (23 e 38%) (GALLIMORE et al., 2004), no Pará em 2003 (9,8%) (ARAGÃO et al., 2009) e no Espírito Santo entre os anos de 2004 a 2006 (39,7%) (RIBEIRO et al., 2008).

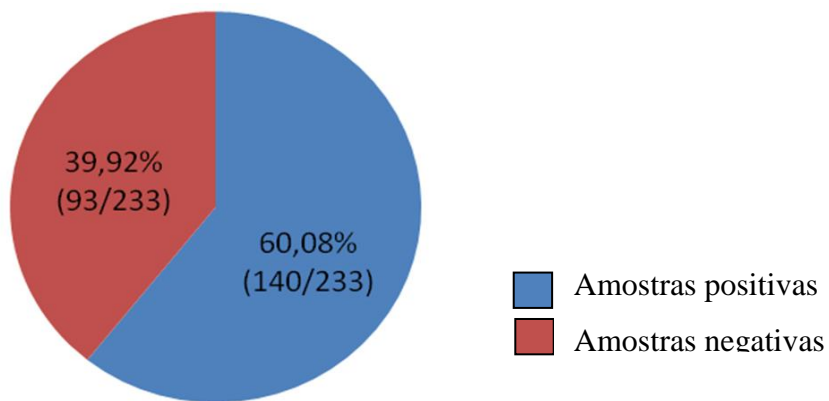


Figura 01. Total de amostras analisadas pelo teste ELISA (Ridascreen[®] Norovirus 3^a geração, R-Biopharm, Alemanha).

Dentre as amostras positivas, houve predominância para o sexo masculino (55,71%), sendo detectada a infecção por NoV em 78 amostras no sexo masculino e 62 no sexo feminino (Figura 02); entretanto, ainda não há relatos na literatura que fazem a correlação entre infecção por NoV e gênero.

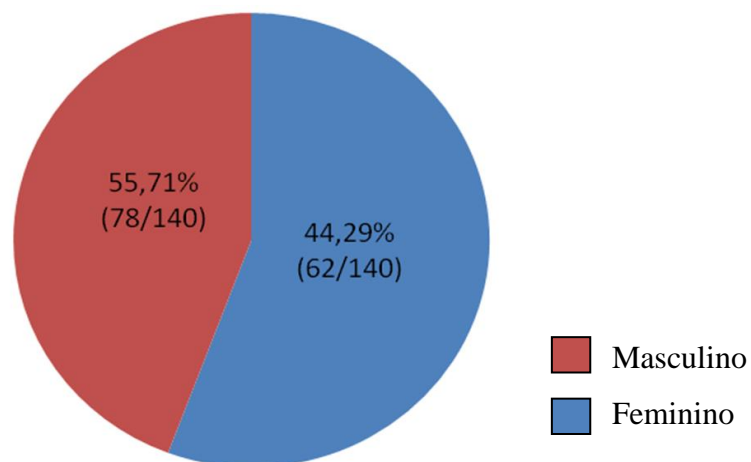


Figura 02. Resultado das amostras positivas analisadas por ELISA, em relação ao gênero.

Uma alta incidência da infecção por NoV é relatada entre as crianças menores de cinco anos de idade (GLASS et al., 2001). Neste estudo conduzido com crianças desta faixa etária, foi observada alta frequência da infecção por NoV entre as crianças abaixo de três anos de idade, sendo as crianças entre 1 a 2 anos de idade as mais atingidas (Gráfico 01). Houve uma redução na frequência da infecção nas crianças acima de 3 anos de idade, fato que pode estar relacionado à imunidade adquirida pela maioria das crianças devido a infecções sintomáticas ou assintomáticas que surgem até os cinco anos de idade, assim como acontece nos casos de infecção por Rotavírus (CHANDRAN et al., 2010).

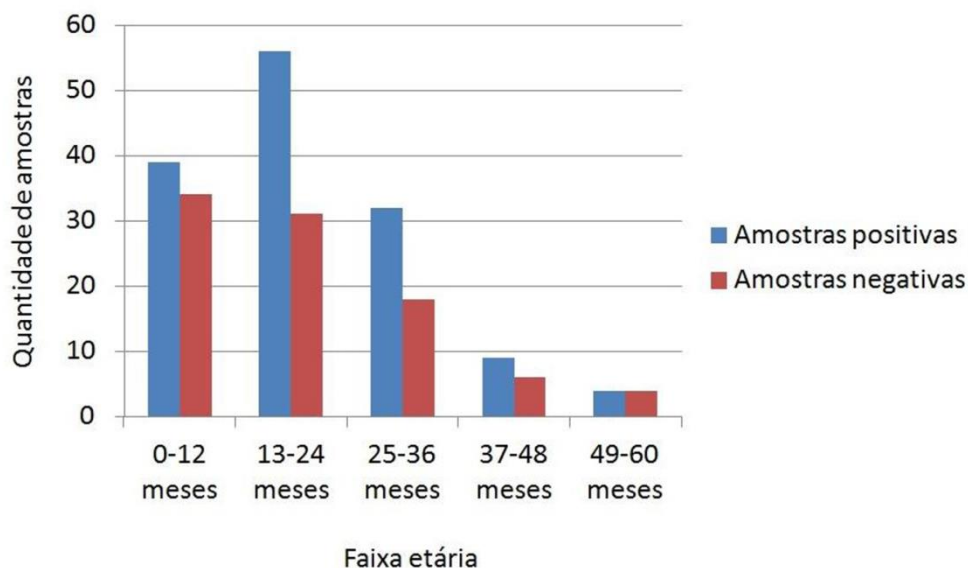


Gráfico 01: Distribuição das amostras por faixa etária nas crianças com gastroenterite, analisadas por ELISA.

O teste ELISA utilizado neste estudo permite a detecção do antígeno do NoV e, portanto, não o classifica genotipicamente. Para a detecção do vírus foi realizado o RT-PCR, teste considerado padrão ouro no diagnóstico da infecção por NoV, por apresentar alto grau de sensibilidade e especificidade (BRUIN et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2011). Do total de 140 amostras positivas pelo ELISA, 47 foram submetidas ao RT-PCR, todas com resultados

positivos. Dentre estas, foram selecionadas, aleatoriamente, 28 amostras, as quais foram submetidas ao sequenciamento genético. Após a análise das mesmas no NCBI/BLAST, foi constatado que todas as amostras apresentaram alto grau de identidade com cepas GII.4. (95 a 99%), corroborando com outros estudos, onde a cepa GII.4 é a reponsável pela maioria das infecções por NoV (DONALDSON et al., 2008).

Os resultados deste estudo evidencia o NoV como um importante agente etiológico da gastroenterite em crianças no período estudado, corroborando com diversos estudos realizados no Brasil (GALLIMORE et al., 2004; CASTILHO et al., 2006; SOARES et al., 2007; NAKAGOMI et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008; ARAGÃO et al., 2009). A cepa GII.4 destaca-se como a possível cepa responsável pelas infecções por NoV na cidade de Salvador; entretanto, futuros estudos devem ser desenvolvidos para a confirmação da genotipagem das cepas circulantes nesta comunidade.

AGRADECIMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

REFERÊNCIAS

1. Aragão GC, Oliveira DS, Santos MC, Mascarenhas JDP, Oliveira CS, Linhares AC et al. Molecular characterization of Norovirus, Sapovirus and Astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. *Rev Pan-Amaz Saúde*. 2009;1:149-58.
2. Atmar RL, ESTES MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* 2006;35:275-90.
3. Bruin E, Duizer E, Vennema H, Koopmans MPG. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods*. 2006;137:259-64.
4. Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, Paniagua M, Lindgren PE, Espinoza F et al. Pediatric Norovirus diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol*. 2008;46:2573-80.
5. Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinjé J, RácZ ML. Genetic diversity of Norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo state, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2006;44:3947-53.
6. Chandran A, Fitzwater S, Zhen A, Santosham M. Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy and potential impact of vaccines. *Biologics: Targets & Therapy*. 2010;4:213-29.
7. Chen SY, Tsai CN, Lai MW, Chen CY, Lin KL, Lin TY et al. Norovirus infection as a cause of diarrhea – associated benign infantile seizures. *Clin Infect Dis*. 2009;48:849-55.
8. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Reviews*. 2008;225:190-211.
9. Gallimore CI, Barreiros MAB, Brown DWG, Nascimento JP, Leite JPG. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:321-6.
10. Georgiadis S, Pilger DA, Pereira F, Cantarelli VV. Molecular evaluation of norovirus in patients with acute gastroenteritis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(3):277-280.

11. Glass RI, Bresee J, Jiang B, Gentsch J, Ando T, Fankhauser R, Noel J, Parashar U, Rosen B, Monroe SS. Gastroenteritis viruses: an overview. *Novartis Found Symp.* 2001;238:5-19; discussion 18-25.
12. Karst SM. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses.* 2010;2:748-81.
13. Koek AG, Bovée LPMJ, Van den Hoek JAR, Bos AJ, Bruisten SM. Additional value of typing noroviruses in gastroenteritis outbreaks in Amsterdam, the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 2006;35:167-72.
14. Li J, Predmore A, Divers E, Lou F. New interventions against human Norovirus: progress, opportunities and challenges. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012;3:331-52.
15. Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FMU, Cuevas LE, Cunliffe NA et al. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity in comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch. Virol.* 2008;153:957-60.
16. Okitsu-Negishi S, Nhuyen TA, Phan TG, Ushijima H. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. *Pediatrics International.* 2004; 46:245-52.
17. Parks CG, Moe CL, Rhodes D, Lima A, Barrett L, Tseng F et al. Genomic diversity of "Norwalk like viruses" (NLVs): pediatric infections in a brazilian shantytown. *J Med Virol.* 1999;58:426-34.
18. Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Norovirus: a comprehensive review. *J Clin Virol.* 2009; 44:1-8.
19. Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar U. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 2008;14:1224-31.
20. Ribeiro LR, Giuberti RSO, Barreira DMPG, Saick KW, Leite JPG, Miagostovich MP et al. Hospitalization due to norovirus genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2008;103:201-6.
21. Schreier E, Döring F, Könkel U. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Arch. Virol.* 2000;145:443-53.

22. Siqueira JAM, Linhares AC, Oliveira DS, Soares LS, Lucena MSS, Wanzeller ALM et al. Evaluation of third-generation RIDASCREEN enzyme immunoassay for the detection of norovirus antigens in stool samples of hospitalized children in Belém, Pará, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;71:391-5.
23. Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MCM, Maranhão AG, Rocha LN et al. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1244-6.
24. Vinjé J, Koopmans MPG. Molecular detection and epidemiology of small round structured viruses in outbreak of gastroenteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.* 1996;174:610-5.
25. Xavier MPTP, Oliveira SA, Ferreira MSR, Victoria M, Miranda V, Silva MFM et al. Detection of caliciviruses associated with acute gastroenteritis in Salvador, an urban Center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42:438-44.
26. Zheng DP, Ando T, Frakhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 2006;346:312-23.

6 MANUSCRITO 2

DETECÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA DIARREIA AGUDA EM CRIANÇAS DE UMA UNIDADE DE EMERGÊNCIA PEDIÁTRICA

Sérgio Rodrigo Figueredo Rocha¹, Luciana Rodrigues Silva^{1,2,*}, Gúbio Soares Campos³, Camila Fonseca Lopes Brandão^{3,4}, Fabiana Lopes de Paula^{3,5}, Isabela Brandão Peixoto³, Eduardo Hage Carmo⁶, Marcus Welby-Borges³, Sílvia Inês Sardi³.

¹Centro de Estudos em Gastroenterologia e Hepatologia Pediátricas, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia

²Hospital Aliança, Salvador, Bahia

³Laboratório de Virologia, Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia

⁴Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Baiano, Santa Inês, Bahia

⁵Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Santo Antônio de Jesus, Bahia

⁶Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia

*Autor para correspondência

Centro de Estudos em Gastroenterologia e Hepatologia Pediátricas

Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (HUPES)

Universidade Federal da Bahia

Rua Augusto Viana, S/N

Canela. CEP: 40110-060

Salvador, Bahia, Brazil

E-mail: lupe.ssa@uol.com.br

RESUMO

A gastroenterite aguda é uma das principais causas de morbi-mortalidade no mundo, especialmente entre aqueles indivíduos com até cinco anos de idade nos países em desenvolvimento. Muitos agentes infecciosos podem estar associados a esta patologia, porém os vírus são os principais responsáveis pelas gastroenterites endêmicas e epidêmicas e, entre estes, são principalmente identificados o Rotavírus (RV) do grupo A, o Norovírus (NoV) e o Adenovírus (AdV). O objetivo deste trabalho foi detectar os agentes etiológicos da gastroenterite em crianças atendidas no período de março de 2010 a março de 2011 em um serviço de Emergência Pediátrica da cidade de Salvador, Bahia, Brasil. Para esta detecção foram analisadas 334 amostras de fezes, de crianças com diarreia aguda, através de testes imunoenzimáticos e coprocultura. Os dados obtidos na anamnese foram armazenados para posterior análise. Do total de 334 amostras, foi observada uma frequência de 51,20% (171/334) de infecções virais, sendo 41,9% (140/334) por RV; 5,08% (17/334) de AdV e 4,19% (14/334) de NoV. As infecções por bactérias foram encontradas em 2,1% (7/334) das amostras analisadas, sendo 1,19% (4/334) por *Salmonella sp*; 0,89% (3/334) por *Shigella sonnei* e 0,6% (2/334) por *Campylobacter sp*. Ainda foram encontradas infecções mistas: 4 amostras apresentaram infecções por dois vírus e outras 3 amostras por bactéria e vírus. A infecção por AdV teve maior ocorrência na faixa etária de pacientes de 1 a 4 anos de idade (70%); por RV na faixa etária acima de 4 anos de idade (54,3%) e por NoV em crianças acima de 1 ano de idade (85,70%). Os principais sintomas observados foram vômitos, febre e diarreia, sendo este último observado em 94% dos pacientes com RV, 78% com NoV e 64,7% com AdV. O maior número de casos ocorreu no mês de julho, supostamente devido ao maior índice pluviométrico, característica regional desta época do ano. Estes dados identificam, nesta

comunidade, gastroenterites relacionadas ao NoV e outros agentes etiológicos, reforçando a necessidade de intervenções preventivas para modificar esse panorama.

Palavras-Chave: gastroenterites, adenovírus, rotavírus, norovírus, infecções mistas.

INTRODUÇÃO

A gastroenterite aguda é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo na faixa etária pediátrica, especialmente entre crianças com até cinco anos de idade nos países em desenvolvimento. A mortalidade global é estimada em dois milhões por ano, principalmente nestes países (OKITSU-NEGISHI et al. 2004). Embora com baixa mortalidade nos países desenvolvidos, a gastroenterite é uma das doenças mais comuns que necessitam de hospitalização, o que a torna uma questão de saúde pública de grande importância. Muitos agentes infecciosos (bactérias, parasitas e vírus) podem estar associados, mas os vírus são os principais responsáveis pelas gastroenterites endêmicas e epidêmicas e entre estes são principalmente identificados, o Rotavírus (RV) do grupo A, o Norovírus (NoV) e o Adenovírus (AdV). Estes vírus têm sido descritos mais recentemente como causas etiológicas de diarreia aguda (GLASS et al. 2006; SOARES et al., 2002).

O NoV é o principal causador de surtos de gastroenterite aguda de origem não bacteriana em todo o mundo, sendo responsável por mais de 95% dos casos nos Estados Unidos e Europa (ASANAKA et al., 2005; GUERRANT et al., 1990). O vírus é transmitido através de alimentos e água contaminados e pelo contato “pessoa-a-pessoa” pela via oral-fecal e é altamente contagioso. As infecções podem ocorrer em casos esporádicos ou em grandes surtos de diarreia aguda em enfermarias de hospitais, escolas, universidades, acampamentos, navios de cruzeiro, hotéis e restaurantes (JOHANSSON et al., 2002). O NoV permanece estável no ambiente por longos períodos e a dose necessária para causar infecção é baixa, o que facilita o aparecimento dos episódios diarreicos. A facilidade de transmissão e a falha no diagnóstico dificultam o controle dos surtos. As infecções por este vírus podem causar

sintomas como vômitos, diarreia aquosa, cólicas abdominais, febre e mal estar geral. (HUTSON et al., 2004; WIDDOWSON et al., 2005).

No Brasil, as gastroenterites associadas ao NoV são frequentemente encontradas em crianças (CASTILHO et al., 2006; GALLIMORE et al., 2004; NAKAGOMI et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008), entretanto, com a utilização de técnicas de biologia molecular (RT-PCR) detectou-se, de forma pioneira na Bahia, infecções por este vírus associado a um surto de gastroenterite entre jovens adultos (CAMPOS et al., 2008).

O diagnóstico para NoV é baseado na detecção do vírus em amostras de fezes por microscopia eletrônica, métodos imunoenzimáticos ou reação em cadeia da polimerase (PCR). A microscopia eletrônica apresenta como vantagem a identificação de infecções mistas, mas é pouco sensível e poucos laboratórios dispõem dos equipamentos necessários. O teste ELISA é de simples e rápida execução, porém menos sensível que a reação em cadeia da polimerase. Assim, dentre os métodos citados, o PCR tem se mostrado o mais sensível e específico para a detecção do NoV (GEORGIADIS et al., 2010). Baseado na análise da sequência parcial ou completa dos genes que codificam a RNA polimerase viral ou a proteína do capsídeo viral (VP1), o NoV pode ser classificado em cinco genogrupos (GI, GII, GIII, GIV e GV) (KAGEYAMA et al., 2004), dos quais três (GI, GII e GIV) são encontrados em humanos. (GREEN et al., 2000). Dentre estes, o genogrupo GII é considerado como o mais prevalente no mundo (SIQUEIRA et al., 2011), sendo o genótipo 4 responsável por aproximadamente 80% de todas as infecções (DONALDSON et al., 2008).

O RV é uma causa muito comum de diarreia aguda em crianças de todo o mundo, principalmente naquelas com menos de 5 anos de idade, e a mortalidade global associada com infecções por RV tem sido estimada em 454.000 a 705.000 mortes por ano, predominantemente em países em desenvolvimento. (PARASHAR et al., 2003; PARASHAR et al., 2006). No Brasil, dados epidemiológicos apontam que o índice de prevalência da

infecção por RV no país variam de 12% a 42%, sendo este vírus responsável por 30% do total de casos de diarreia agudas causados por vírus entéricos (LINHARES, 2000).

O RV possui um triplo capsídeo proteico, composto por 6 proteínas estruturais (VP1 a VP7) e 5 não estruturais (NSP1 a NSP5) codificadas por 11 segmentos de RNA de fita dupla de polaridade positiva. Sua classificação pode ser baseada na característica eletroforética do RNA genômico e nos estudos moleculares de suas proteínas estruturais. A análise dos diferentes perfis de migração, após eletroforese em gel de poliacrilamida, permite a classificação do RV em sete eletroferogrupos (A a G). Entretanto, a determinação do eletroferogrupo não deve ser utilizada como o único método de classificação do RV, pois podem ocorrer alterações no genoma viral e, conseqüentemente, no padrão de migração. Assim, a classificação do RV pode ser determinada pelo conjunto de informações moleculares de suas proteínas estruturais VP6, VP7 e VP4. Através dos estudos moleculares com a proteína estrutural VP6, o RV pode ser classificado em 7 grupos, denominados de A a G, sendo o grupo A o mais preponderante nos casos de gastroenterite por RV no mundo. Por outro lado, estudos desenvolvidos com as proteínas estruturais VP7 e VP4 classificam o RV em genótipos G (glicoproteína) e P (sensível à proteólise), respectivamente (ESTES, 2001). Em crianças, o RV do grupo A é o principal agente etiológico de gastroenterite viral e é responsável por 29% a 45% de hospitalizações em todo o mundo (PARASHAR et al., 2003; PARASHAR et al., 2006).

O AdV é uma das principais causas de diferentes síndromes clínicas, incluindo gastroenterites, doenças respiratórias, conjuntivite, cistite hemorrágica e exantema (HORWITZ et al., 2001). Eles compreendem 51 diferentes sorotipos (AdV 1 - 51), agrupados em 6 espécies (A a F) (DE JONG et al., 1999). No Brasil, alguns relatos descrevem a infecção por AdV em crianças com gastroenterite, demonstrando seu envolvimento em casos de

gastroenterite infantil e aguda (LEITE et al., 1985; HARSI et al., 1995; SOARES et al., 2002).

As gastroenterites causadas por patógenos bacterianos são mais encontradas em países em desenvolvimento e as principais bactérias envolvidas são: *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli* (DALBY-PAYNE; ELLIOTT, 2010). Dentre estas, a bactéria *Campylobacter* tem sido associada como o principal agente etiológico das gastroenterites bacterianas (ALLOS, 2001).

O presente estudo objetivou detectar os agentes etiológicos das diarreias em crianças com gastroenterite aguda, atendidas de março de 2010 a março de 2011, em um serviço de emergência pediátrica no município de Salvador, Bahia.

MATERIAIS E METÓDOS

Este estudo prospectivo descritivo foi realizado com crianças, com sintomas de gastroenterite, atendidas na emergência pediátrica de um hospital particular em Salvador, no período de março de 2010 a março de 2011, as quais tiveram o prontuário preenchido pelos plantonistas para coleta e, posterior, análise dos dados.

Um total de 334 amostras de fezes destes pacientes foi coletado na emergência e encaminhado para o laboratório do próprio hospital ou para o Laboratório de Virologia (ICS-UFBA) para a realização de testes imunoenzimáticos e coprocultura para a identificação do agente etiológico da gastroenterite.

Após a identificação do agente etiológico, foram avaliados os prontuários dos pacientes hospitalizados, onde características demográficas (nome, idade, gênero, etc) e sintomas (febre, vômito, dor abdominal, desidratação e duração dos sintomas) foram relacionados com fatores temporais e climáticos (pluviosidade e temperatura), na época da internação, fornecidos pelo Instituto de Meteorologia, Bahia (INMET-BA). Quanto à idade, os pacientes foram distribuídos em faixas etárias: até 1 ano, de 1 a 4 anos e maior que 4 anos.

Foram realizadas análises exploratórias (descritivas) dos dados, a partir da apuração de frequências simples absolutas e percentuais para as variáveis categóricas e a organização dos resultados em tabelas e gráficos utilizando o Excel.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Salvador (UNIFACS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 334 amostras de fezes de crianças atendidas no serviço de emergência pediátrica com sintomas de gastroenterite aguda. Após a realização dos testes de diagnóstico, foi observada uma frequência de 51,20% (171/334) de infecções virais, sendo 41,9% (140/334) por RV; 5,08% (17/334) de AdV e 4,19% (14/334) de NoV (Figura 01). As infecções por bactérias foram encontradas em 2,1% (7/334) das amostras analisadas, sendo 1,19% (4/334) por *Salmonella sp*; 0,89% (3/334) por *Shigella sonnei* e 0,6% (2/334) por *Campylobacter sp* (Figura 02). Ainda foram encontradas infecções mistas, sendo 4 amostras entre dois vírus (NoV-RV e AdV-RV), 2 entre bactéria e AdV e 1 entre bactéria e RV (Figura 03). Nos demais pacientes, não foram encontradas as causas da gastroenterite.

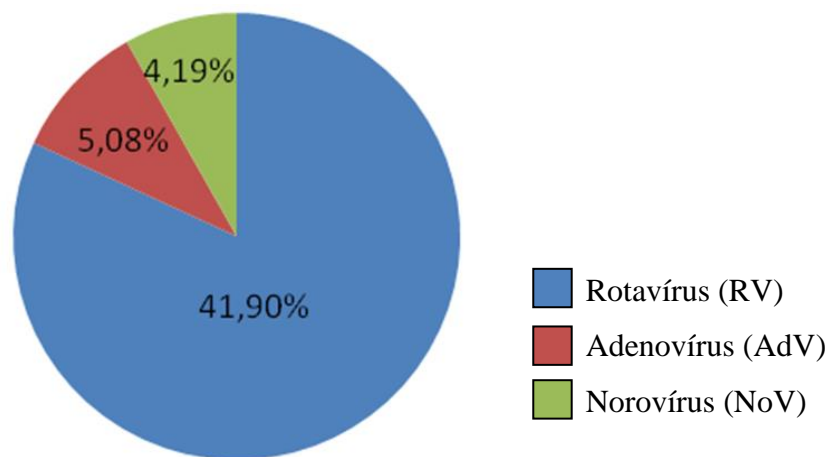


Figura 01. Distribuição dos agentes virais causadores da gastroenterite nas crianças deste estudo.

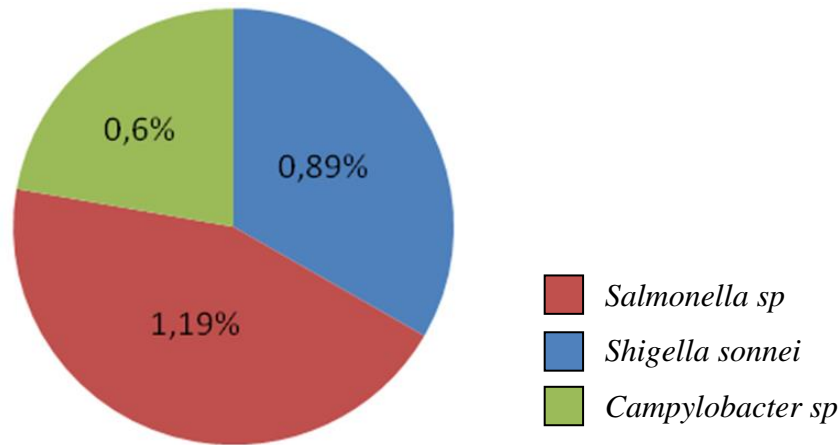


Figura 02. Distribuição dos agentes bacterianos causadores da gastroenterite nas crianças deste estudo.

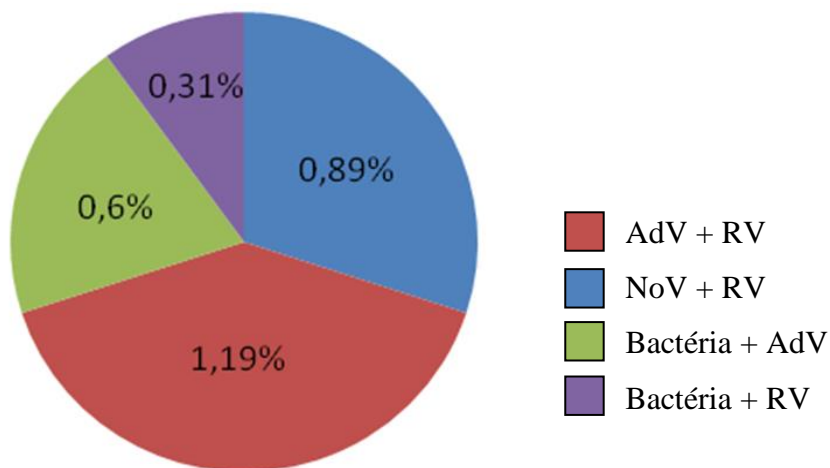


Figura 03. Distribuição das infecções mistas causadoras da gastroenterite nas crianças deste estudo.

A Tabela 01 mostra a distribuição dos agentes etiológicos virais da gastroenterite nas crianças de acordo com as diferentes faixas etárias das crianças. Nela pode-se observar que a maior ocorrência da infecção por AdV ocorreu em crianças entre 1 a 4 anos de idade (70,6%), por RV em crianças acima de 4 anos (54,3%) e por NoV houve alta ocorrência entre as faixas etárias de 1 a 4 anos e acima de 4 anos de idade (42,85% cada). Dentre as infecções

bacterianas a maior frequência (44,4%) foi observada em pacientes maiores de 4 anos e, em 144 crianças não houve identificação do agente etiológico da diarreia.

Tabela 01: Distribuição dos agentes etiológicos virais da gastroenterite entre as faixas etárias das crianças atendidas na emergência pediátrica.

Faixa etária das crianças		AdV		RV		NoV	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Idade	0 a 1 ano	1	5,9	15	10,7	2	14,3
	1 a 4 anos	12	70,6	49	35	6	42,85
	> 4 anos	4	23,5	76	54,3	6	42,85
Total		17	100	14	100	14	100

As infecções virais intestinais são a causa mais comum de gastroenterite infecciosa aguda em crianças. Estimativas em todo o mundo indicam uma média de 7 a 30 episódios de diarreia durante os cinco primeiros anos de vida e estas são descritas como a segunda maior causa de morte em crianças nesta idade, sobretudo em áreas em desenvolvimento (KAPIKIAN et al., 1996; GLASS et al., 1997; BRYCE et al., 2008). Os dados obtidos no presente trabalho reforçam a importância das infecções virais como responsável pelas doenças entéricas agudas em pacientes pediátricos tanto em países industrializados, quanto em desenvolvimento (IRITANI et al., 2003; NUNES et al., 2010).

Infecções mistas geralmente não são esperadas, mas ocorrem e, portanto, acabam sendo subdiagnosticadas e, assim, os dados sobre elas podem oscilar amplamente na literatura. Alguns autores, em estudos anteriores, identificaram infecções mistas em percentuais que variaram de 4,4% a 29% das amostras de fezes com presença de micro-

organismos patogênicos quando submetidas a técnicas clássicas ou moleculares de identificação (MARIE-CARDINE et al., 2002; OH et al., 2003; LEVIDIOTOU et al., 2009). Estes dados, associados aos resultados obtidos em nossas análises, enfatizam a importância clínica da detecção das infecções mistas como uma causa de diarreia em crianças hospitalizadas. Um fator que pode ser responsável pela variação no índice de detecção das infecções mistas é a não disponibilidade de técnicas necessárias para a identificação de todos os agentes das diarreias agudas em serviços públicos, por serem mais complexas e dispendiosas.

A gastroenterite aguda é caracterizada por diarreia com ou sem vômito, náusea, febre e dor abdominal (DALBY-PAYNE; ELLIOTT, 2010). Nas crianças atendidas na emergência pediátrica foram observadas como principais sintomatologias, decorrentes das infecções virais: diarreia, vômitos e febre (Tabela 02).

Tabela 02: Principais sintomatologias gastrointestinais observadas nas crianças atendidas na emergência pediátrica.

Sintomas Gastrointestinais	AdV		RV		NoV	
	N	%	N	%	N	%
Diarreia	11/17	64,7	132/140	94	11/14	78
Vômitos	09/17	52,9	120/140	85,7	08/14	57,1
Febre	04/17	23,5	80/140	57,1	06/14	42,9

- ❖ As percentagens são dadas em relação ao número de pacientes com o sintoma pelo número de pacientes com a virose.

Através da análise univariada, os sintomas gastrointestinais foram encontrados com maior prevalência nas crianças acima de 4 anos de idade; por outro lado, as crianças entre 0 a 1 ano de idade tiveram redução na presença de sintomatologia, o que possivelmente se deve ao fato destas crianças estarem em fase de lactação e, conseqüentemente, os anticorpos maternos presentes no leite proporcionam um efeito protetor (ASENSI et al., 2006; MAKITA et al., 2007).

O principal período com incidência de gastroenterites agudas ocorreu em julho de 2010, totalizando 139 pacientes (41,62% do total de pacientes no período de estudo) (Gráfico 01). A gastroenterite estava praticamente ausente em novembro de 2010, quando foram registrados apenas dois casos. Segundo o INMET-BA, os índices pluviométricos mais altos foram detectados em abril (448,8cm), maio (243,8cm), julho (492,5cm) e agosto (176,3cm), e a temperatura média anual foi de 25,5°C.

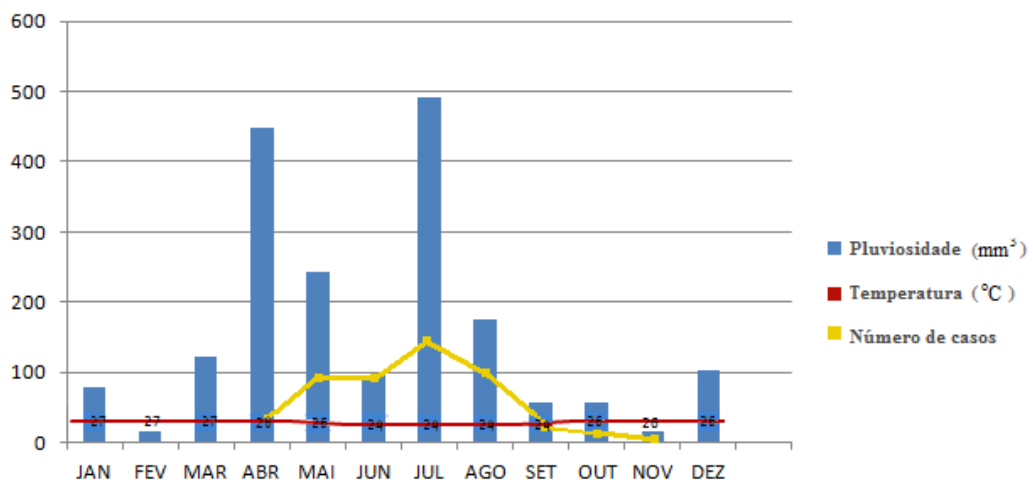


Gráfico 01: Sazonalidade das infecções virais no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2010. Fonte: INMET-BA.

Como descrito no Brasil, também em outros países, as gastroenterites, principalmente as virais apresentam um padrão sazonal, com um aumento da incidência durante os meses frios e/ou chuvosos (MEDICI et al., 2004). Neste estudo, pode-se observar o aumento da incidência de diarreias no mês que apresentou maior índice pluviométrico (julho); entretanto, tais variações não se mostraram tão expressivas, como as observadas em países de clima temperado, onde ocorrem extensas epidemias durante os meses de inverno.

Este trabalho analisou a etiologia das gastroenterites em crianças atendidas em uma unidade de saúde na cidade de Salvador-BA, enfatizando que os NoV, RV e AdV são importantes causadores de gastroenterites virais agudas em crianças, o que corrobora com os dados obtidos em estudos anteriores no Brasil e no mundo (DE WIT et al., 2001; OH et al., 2003; LEVIDIOTOU et al., 2009), apesar da vacinação para algumas dessas viroses serem sistematicamente administradas.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem a necessidade de monitoramento constante das infecções por causas virais, bem como das infecções mistas e de intervenções preventivas para mudar esse panorama. Concomitantemente, estes podem contribuir com informações que possam apoiar e nortear ações voltadas para redução dos impactos socioeconômicos relacionados às diarreias virais, tais como: a perda de dias de trabalho por parte dos pais, a perda de dias de escola para as crianças, o aumento da demanda por serviços de saúde e hospitalização. As consequências inerentes às infecções que não forem detectadas corretamente podem expor as crianças a outras doenças, ocasionando o aumento da morbidade, por causas que poderiam ter sido evitadas. Neste caso, os custos envolvidos no atendimento destes pacientes, seriam menos dispendiosos. Enfatiza-se ainda, a necessidade do conhecimento atualizado dos pediatras sobre os agentes virais recentemente identificados como causadores da diarreia aguda, reforçando a não utilização de antibioticoterapia nestes casos e a orientação aos pais sobre as condutas higiênicas na prevenção destes quadros.

REFERÊNCIAS

1. Allos BM (2001) *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. Clin Infect Dis. 32:1201-6.
2. Asanaka M, Atmar RL, Ruvolo V, Crawford SE, Neill FH, Estes MK (2005) Replication and packing of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. Proc Nat Acad Sciences. 102:10327-10332.
3. Asensi MT, Martínez-Costa C, Buesa J (2006) Anti-rotavirus antibodies in human milk: quantification and neutralizing activity. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 42(5):560-567.
4. Bryce J, Daelmans B, Dwivedi A, Fauveau V, Lawn JE, Mason E, Newby H, Shankar A, Starrs A, Wardlaw T (2008) Countdown to 2015 for maternal, newborn, and child survival: the 2008 report on tracking coverage of interventions. Lancet. 371(9620):1247-1258.
5. Campos GS, Moreau VH, Bandeira A, Barberino G, Almeida PF, Amador DM, Lima MO, Sardi SI (2006) Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. Arch Virol. 153:1125-1129.
6. Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinjé J, Rác ML (2006) Genetic diversity of Norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo state, Brazil. J Clin Microbiol. 44:3947-3953.
7. Dalby-Payne JR, Elliott EJ (2010) Gastroenteritis in children. Clin Evid (online). 2011;2011:0314.
8. De Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Wannet WJ, Vinjé J, Van Leusden F, Bartelds AI, Van Duynhoven YT (2001) Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. Am J Epidemiol. 154:666-674.

9. De Jong RN, Van der Vliet PC (1999) Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. *Gene*. 236:1-12.
10. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS (2008) Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Reviews*. 225:190-211.
11. Estes MK (2001) Rotaviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (ed) *Fields Virology*, 4th edn Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp1747-1785.
12. Gallimore CI, Barreiros MAB, Brown DWG, Nascimento JP, Leite JPG (2004) Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 37:321-326.
13. Georgiadis S, Pilger DA, Pereira F, Cantarelli VV (2010) Molecular evaluation of norovirus in patients with acute gastroenteritis. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(3):277-280.
14. Glass RI, Kilgore PE (1997) Etiology of acute viral gastroenteritis. In: Garcey M, Walker-Smith JA (ed) *Diarrheal Disease (Nestlé Nutrition Workshop Series)*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp39-54.
15. Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, Jiang B, Gentsch JR (2006) Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet*. 368:323-332.
16. Green J, Vinjé J, Gallimore CI, Koopmans M, Hale A, Brown DWG (2000) Capsid protein diversity among Norwalk-like viruses. *Virus genes*. 20:227-236.
17. Guerrant RL, Hughes JM, Lima NL, Crane J (1990) Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. *Rev Infec Dis*. 12:41-50.
18. Harsi CM, Rolim DP, Gomes SA, Gilio AE, Stewien KE, Baldacci ER, Candeias JA (1995) Adenovirus genome types isolated from stools of children with gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil. *J Med Virol*. 45:127-134.
19. Horwitz MS (2001) Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM (ed) *Fields Virology*, 5th edn Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp2301-2326.

20. Hutson AM, Atmar RL, Estes MK (2004) Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol.* 12:279-287.
21. Iritani N, Seto Y, Kubo H, Murakami T, Haruki K, Ayata M, Ogura H (2003) Prevalence of Norwalk-like virus infections in cases of viral gastroenteritis among children in Osaka city, Japan. *J Clin Microbiol.* 41(4):1756-1759.
22. Johansson HPJ, Torvén M, Hammarlund AC, Björne U, Hedlund KO, Svensson L (2002) Food-borne outbreak of gastroenteritis associated with genogroup I Calicivirus. *J Clin Microbiol.* 40:794-798.
23. Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K (2004) Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J Clin Microbiol.* 42:2988-2995.
24. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM (2007) Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM (ed) *Fields Virology*, 5th edn Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp1787-1833.
25. Kapikian AZ (1996) Overview of viral gastroenteritis. *Arch Virol Suppl.* 12: 7-19.
26. Leite JP, Pereira HG, Azeredo RS, Schatzmayr HG (1985) Adenoviruses in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol.* 15:203-209.
27. Levidiotou S, Gartzonika C, Papaventsis D, Christaki C, Priavali E, Zotos N, Kapsali E, Vrioni G (2009) Viral agents of acute gastroenteritis in hospitalized children in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 15:596-598.
28. Linhares AC (2000) Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para seu controle. *Caderno de Saúde Pública.* 16:629-646.
29. Makita K, Hayakawa Y, Okame M, Homma K, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H (2007) First detection of IgA against norovirus in breast milk. *Clin Lab.* 53:125-128.
30. Marie-Cardine A, Goullain K, Mouterde O, Castignolles N, Hellot MF, Mallet E, Buffet-Janvresse C (2002) Epidemiology of acute viral gastroenteritis in children hospitalized in Rouen, France. *Clin Infect Dis.* 34:1170-1178.

31. Medici MC, Martinell M, Arcangeletti MC, Pinard F, De Conto F, Dodi I, Viridis R, Abelli LA, Aloisi A, Zerbini L, Valcavi P, Calderaro A, Bernasconi S, Izzi GC, Dettori G, Chezzi C (2004) Epidemiological aspects of human rotavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in an area of northern Italy. *Acta Biomed.* 75:100-106.
32. Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FMU, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA (2008) Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol.* 153:957-960.
33. Nunes AA, Mello LM, Parrode RN, Bittar JPM (2010) Prevalence of rotavirus in feces of children with acute diarrhea: clinical signs and associated symptoms. *Revista AMRIGS.* 54 (2):147-151.
34. Oh DY, Gaedicke G, Schreier E (2003) Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity. *J Med Virol.* 71:82-93.
35. Okitsu-Negishi S, Nguyen TA, Phan TG, Ushima H (2004) Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. *Pediatr Int.* 46:245-252.
36. Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI (2006) Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 12:304-306.
37. Parashar UD, Hummelman EG, Bresse JS, Miller MA, Glass RI (2003) Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 9:565-572.
38. Ribeiro LR, Giuberti RSO, Barreira DMPG, Saick KW, Leite JPG, Miagostovich MP, Spano LC (2008) Hospitalization due to norovirus genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 103:201-206.
39. Siqueira JAM, Linhares AC, Oliveira DS, Soares LS, Lucena MSS, Wanzeller ALM, Mascarenhas JD, Gabbay YB (2011) Evaluation of third-generation RIDASCREEN enzyme immunoassay for the detection of norovirus antigens in stool samples of hospitalized children in Belém, Pará, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 71:391-395.
40. Soares CC, Volotão EM, Albuquerque MC, da Silva FM, de Carvalho TY, Nozawa CM, Linhares RE, Santos N (2002) Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four Brazilian cities. *J Clin Virol.* 23:171-177.

41. Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, Beard RS, Chaves SS, Hammond R, Salehi EDP, Swanson E, Totaro J, Woron R, Mead PS, Bresee JS, Monroe SS, Glass RI (2005) Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerg Infect Dis.* 11:95-102.

7 MANUSCRITO 3

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE TESTES IMUNOENZIMÁTICOS PARA A DETECÇÃO DE NOROVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS

Fabiana Lopes de Paula^{1,2}; Sílvia Inês Sardi¹; Aryane Cruz Oliveira Pinho¹; Isabela Brandão Peixoto¹; Marcus Welby-Borges¹; Cláudio José de Freitas Brandão^{3,4}; Antônio Bandeira³; Gilson Correia Carvalho⁵; Gúbio Soares Campos¹

¹ Laboratório de Virologia, Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia

² Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Santo Antônio de Jesus, Bahia

³ Hospital Aliança, Salvador, Bahia

⁴ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia

⁵ Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia

RESUMO

As noroviroses, causadas pelo Norovírus (NoV) são as principais causas de gastroenterite aguda em indivíduos de todas as idades, principalmente em crianças. Devido ao NoV ser altamente infeccioso, seu diagnóstico rápido e precoce é importante para prevenir e controlar a doença. Atualmente, vários testes imunoenzimáticos estão disponíveis para a detecção de norovírus, entretanto informações sobre suas eficácias são limitadas. O presente estudo teve como objetivo avaliar os testes imunoenzimáticos ELISA - RIDASCREEN® Norovírus 3ª geração (R-Biopharm, Alemanha) e imunocromatográfico RIDA® QUICK (R-Biopharm, Alemanha), em amostras de fezes de pacientes com gastroenterite aguda em Salvador, Brasil. Comparado com o padrão ouro, reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR), as sensibilidades dos testes ELISA e rápido imunocromatográfico obtidas neste estudo foram de 63,63% e 34,41% respectivamente, e as especificidades de 77,77% e 96,29%, respectivamente. A partir dos dados obtidos verificou-se que o teste ELISA permitiu a verificação rápida e econômica de grande número de amostras e, portanto, pode ser considerada uma ferramenta de diagnóstico útil para a detecção de casos suspeitos de infecção por NoV. Entretanto, a realização do RT-PCR ainda é necessária para a confirmação de casos negativos pelo ELISA.

Palavras-chaves: Norovírus, sensibilidade, especificidade, testes imunoenzimáticos.

ABSTRACT

Noroviruses, caused by Norovirus (NoV), are the leading cause of acute gastroenteritis in people of all ages, mainly in children. Since the virus is highly infectious, rapid and early diagnosis is important to prevent and control the disease. A range of laboratory methods is now available for the detection of norovirus, but there is still only limited information on its efficacy. The present study aimed to evaluate the analytical accuracies of RIDASCREEN® Norovirus 3rd Generation ELISA assay and rapid immunochromatographic RIDA® QUICK Norovirus 3rd Generation (R-Biopharm, Germany), in faecal samples from patients with acute gastroenteritis in Salvador, Brazil. Compared with the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) reference method, the overall diagnostic sensitivities of ELISA and the immunochromatographic assay were 63.63% and 34.41% and the diagnostic specificities were 77.77% and 96.29% respectively. From the data obtained in this study, the ELISA test allows rapid and economic screening of larger numbers of samples and, therefore, can be considered a useful diagnostic tool for the detection of norovirus infection suspected cases. However, for a individual diagnostic result, RT-PCR is still required to confirm the negatives cases to ELISA.

Key-words: Norovirus, sensitivity, specificity, enzyme immunoassays.

INTRODUÇÃO

A gastroenterite é um problema de saúde pública mundial (ZHENG et al., 2006), cujos índices de morbidade e mortalidade são elevados, principalmente em países em desenvolvimento (OKITSU-NEGISHI et al., 2006). Estima-se que, anualmente, ocorra um bilhão de casos em todo o mundo, com quatro a seis milhões de mortes (WHO, 2009).

Dentre os agentes infecciosos (parasitas, bactérias e vírus) que podem estar associados à gastroenterite, destaca-se o Norovírus humano (NoV), que pertence à família *Caliciviridae*, um vírus não envelopado, com capsídeo de morfologia icosaédrica (GLASS et al., 2009). Seu genoma é composto por uma fita simples de RNA com polaridade positiva, organizado em três sequências de leituras abertas (ORF – *open read frame*), que codificam uma poliproteína não estrutural e duas proteínas estruturais (VP1 e VP2), respectivamente (HARDY, 2005).

Com base em análises moleculares, o NoV é classificado em cinco genogrupos (GI, GII, GIII, GIV e GV), entretanto apenas os genogrupos GI, GII e GIV são encontrados em humanos (LEVETT et al., 1996; CASTILHO et al., 2006; MORILLO et al., 2008) e estão associados a surtos e episódios esporádicos de gastroenterites.

A transmissão do NoV ocorre pela ingestão de água e alimentos contaminados ou através do contato entre pessoas infectadas. Suas manifestações clínicas são caracterizadas, na maioria das vezes, por náusea, dor abdominal, vômito, diarreia branda autolimitada, podendo ser sanguinolenta. Entretanto, em alguns casos os vômitos são acompanhados com diarreia abundante, resultando em desidratação e, eventualmente, morte (MORILLO et al., 2008).

Desde a primeira detecção do Norovírus, em 1972, por microscopia eletrônica, durante um surto ocorrido em uma escola de ensino primário em Norwalk (Ohio, EUA), ele foi

relacionado como o primeiro agente etiológico viral da gastroenterite aguda (GREEN et al., 1995; WIDDOWSON et al., 2005; BORGES et al., 2006) e a partir de então, alguns métodos para a detecção do vírus em amostras fecais vem sendo desenvolvidos, como a reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR), os testes de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*) e os testes imunocromatográficos de fluxo lateral.

O RT-PCR, desenvolvido na década de 90, é um método utilizado em todo o mundo que emprega técnicas moleculares para a detecção de agentes virais (WIDDOWSON et al., 2005). Embora este método seja considerado o mais sensível para o diagnóstico do NoV, ele é dispendioso, exige pessoal treinado e equipamentos especializados de custo elevado, tornando-o pouco acessível em países não desenvolvidos e em desenvolvimento e, por isso, é considerado inadequado como método de diagnóstico de rotina (KHAMRIN et al., 2008; KIRBY et al., 2010; POMBUBPA; KITTIGUL, 2012).

Os testes baseados na detecção de antígenos, testes ELISA e imunocromatográficos de fluxo lateral, proporcionam um diagnóstico rápido e de fácil execução, não necessitando de equipamentos sofisticados e processam várias amostras ao mesmo tempo (BRUIN et al., 2006; KHAMRIN et al., 2008; MORILLO et al., 2011), o que permite uma rápida detecção de norovirose, possibilitando a redução da rápida propagação de infecções gastrointestinais (AMBERT-BALAY; POTHIER, 2013; POMBUBPA; KITTIGUL, 2012); entretanto, ainda há poucos relatos na literatura quanto à eficácia destes métodos (BRUGGINK et al., 2011).

Desta forma, o presente estudo objetiva avaliar a sensibilidade e a especificidade dos testes ELISA (RIDASCREEN[®] Norovirus 3rd Generation – R-Biopharm, Alemanha) e imunocromatográfico de fluxo lateral (RIDA[®]QUICK Norovirus – R-Biopharm, Alemanha), em comparação com o RT-PCR, como teste de referência.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 181 amostras fecais de pacientes, de todas as idades, com sintomas de gastroenterite, atendidas no Serviço de Emergência de um Hospital particular em Salvador, Bahia, durante o período de maio a julho de 2012, as quais foram armazenadas a -70°C .

Seguindo o critério da faixa etária do paciente, as amostras foram agrupadas em três categorias: crianças (0-5 e 6-14 anos de idade), adultos (15-59 anos de idade) e idosos (acima de 60 anos de idade).

Todas as amostras coletadas foram primeiramente submetidas ao teste imunocromatográfico de fluxo lateral (RIDA[®] QUICK Norovírus – R-Biopharm, Alemanha) e, posteriormente, ao teste ELISA (RIDASCREEN[®] Norovirus 3rd Generation R-Biopharm, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

O RNA viral de todas as amostras (n=181) foi extraído pela técnica de coluna, com a utilização do Kit QIAmp viral RNA (QIAGEN, Alemanha). Posteriormente, 8 μL do RNA viral extraído foi submetido à reação de transcrição reversa (RT), juntamente com o par de iniciadores CAL-32 (5'-ATGAATATGAATGAGGATGG-3') (SCHREIER et al., 2000) e MO3-N (5'-TCAGATGGGTCTTCATGATTGG-3') (KOEK et al., 2006), utilizando o kit M-MLV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen, USA), seguindo protocolo do fabricante. O volume final da reação foi de 25 μL , e a amplificação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

O produto do RT (638pb) foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR), adicionado ao Go Taq[®] Green Master Mix (composto de Taq DNA polimerase, dATP, dGTP, dCTP, dTTP e MgCl_2 - Promega, USA), e os iniciadores JV-12 (5'-ATACCACTATGATGCAGATTA-3') (VINJÉ; KOOPMANS, 1996) e ACAL-36 (5'-

GACAAAACAGAAGGACCAAT-3') (SCHREIER et al., 2000) para a amplificação de um produto final de 428 pb. O volume final de reação foi de 50µl e a amplificação foi realizada no mesmo termociclador, sob as seguintes condições: 94 °C/3 min, seguido de 30 ciclos de 93 °C/30 seg, 37 °C/15 seg, 72 °C/30 seg e uma fase final de extensão de 72 °C/5 min (KOEK et al., 2006). O produto amplificado foi submetido à corrida eletroforética horizontal, em gel de agarose a 2%, corado em brometo de etídio (1µg/mL) por 15 minutos para a visualização dos fragmentos amplificados em luz ultravioleta e fotodocumentados pelo sistema de fotodocumentação L-Pix Touch (Loccus Biotecnologia).

Para a avaliação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos testes RIDA[®]QUICK Norovirus e RIDASCREEN[®] Norovirus, todas as amostras foram comparadas com o RT-PCR, como teste de referência.

Visando avaliar a significância estatística na comparação da sensibilidade e especificidade dos testes (RIDA[®]QUICK Norovirus e RIDASCREEN[®] Norovirus), foi realizada uma análise de tabela de contingência para dados pareados, seguindo a metodologia descrita por Hawass (1997) e Tamhane (2008). Todas as análises estatísticas foram realizadas através do pacote estatístico Statistica v.8.0 (StatSoft Inc., 2007).

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Salvador (UNIFACS), sob protocolo número 04.11.12.

RESULTADOS

Das 181 amostras fecais de pacientes atendidos com sintomas de gastroenterite, coletadas durante o período de maio a julho de 2012, que foram analisadas, a maioria (58,01% - 105/181) foi de crianças (0 a 14 anos de idade), predominantemente na faixa etária de 0 a 5 anos de idade (47,51% - 86/181), seguida pelos adultos e idosos, 30,94% (56/181) e 11,05% (20/181), respectivamente (Figura 01).

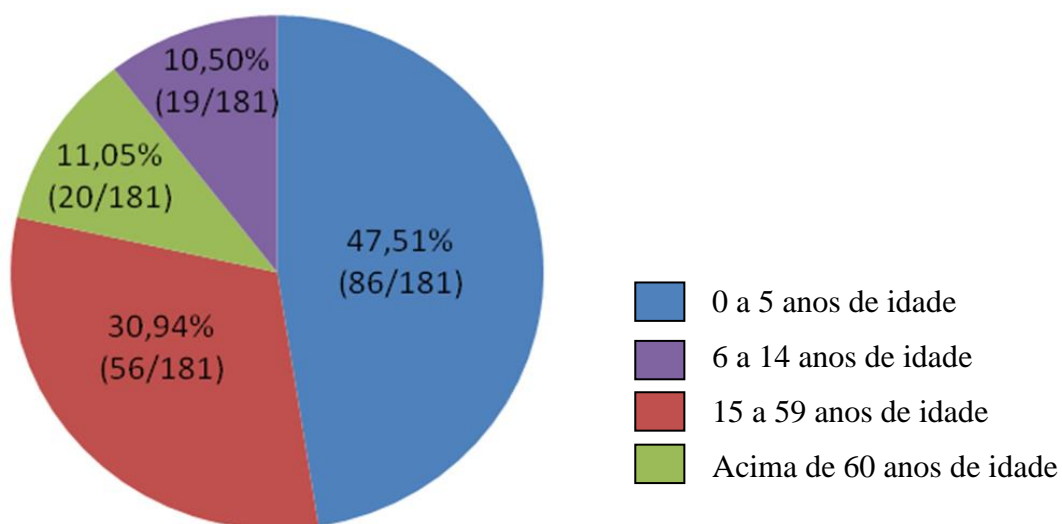


Figura 01: Distribuição das amostras totais, analisadas pela faixa etária.

A presença do NoV foi identificada pelos testes RIDA[®]QUICK Norovírus, RIDASCREEN[®] Norovírus e RT-PCR. Dentre esses, o RT-PCR foi o mais eficiente na detecção do vírus, independente da faixa etária dos pacientes (Tabela 01).

Tabela 01: Distribuição das amostras positivas para NoV analisadas por faixa etária.

Faixa etária	RIDA [®] QUICK Norovírus positivo	RIDASCREEN [®] Norovírus positivo	RT-PCR positivo
0-14 anos	34,28% (36/105)	66,66% (70/105)	90,48% (95/105)
15-59 anos	23,21% (13/56)	46,43% (26/56)	75% (42/56)
Acima de 60 anos	25% (5/20)	40% (8/20)	85% (17/20)
Total	54/181	104/181	154/181

Quando analisadas as amostras negativas tanto para o teste RIDA[®]QUICK Norovírus quanto para o teste RIDASCREEN[®] Norovírus (n=77), foi observado que destas, 72,72% (56/77) tiveram resultado positivo para o RT-PCR (Tabela 02).

Tabela 02: Distribuição das amostras negativas para os testes RIDA[®]QUICK e RIDASCREEN[®] Norovírus.

	RIDA [®] QUICK Norovírus negativo	RIDASCREEN [®] Norovírus negativo	RIDA [®] QUICK e RIDASCREEN [®] Norovírus negativo
RT-PCR positivo	1	6	56
RT-PCR negativo	126	71	21
Total	127	77	77

Do total das amostras analisadas (n=181), 29,81% (53/181) foram positivas para o RT-PCR e RIDA[®]QUICK Norovírus, 14,36% (26/181) foram negativas para ambos os testes e 56,35% (102/181) das amostras tiveram resultados discrepantes, sendo 101 amostras positivas

para o RT-PCR e negativas para o RIDA[®] QUICK Norovírus, e 1 amostra negativa para o RT-PCR e positiva para o RIDA[®] QUICK Norovírus . No total, 154 amostras foram positivas para o RT-PCR. Dentre estas, 53 foram identificadas como positivas para o RIDA[®] QUICK Norovírus (34,42% de sensibilidade). Das 27 amostras negativas para o RT-PCR, apenas uma amostra apresentou resultado positivo para o RIDA[®] QUICK Norovírus (96,30% de especificidade). Os valores preditivos positivos e negativos para o RIDA[®] QUICK Norovírus foram de 98,14% (53/54) e 20,47% (26/127), respectivamente (Tabela 03).

Tabela 03: Detecção de NoV em amostras fecais com RT-PCR e RIDA[®] QUICK Norovirus.

	RT-PCR positivo	RT-PCR negativo	TOTAL
RIDA [®] QUICK Norovírus positivo	53	1	54
RIDA [®] QUICK Norovírus negativo	101	26	127
TOTAL	154	27	181

RIDA[®] QUICK Norovirus:

Sensibilidade = 34,42% (53/154)

Especificidade = 96,30% (26/27)

Valor preditivo positivo = 98,14%

Valor preditivo negativo = 20,47%

Quando comparado o teste RIDASCREEN[®] Norovírus com o padrão ouro, 54,14% (98/181) amostras foram positivas e 11,60% (21/181) negativas para ambos os testes, e 33,15% (62/181) tiveram resultados discrepantes. Das 154 amostras positivas para o RT-PCR, 98 foram positivas para o RIDASCREEN[®] Norovírus (63,64% de sensibilidade) e das 27 amostras negativas para o RT-PCR, 21 apresentaram resultado negativo para o

RIDASCREEN® Norovirus (77,78% de especificidade). Os valores preditivos positivos e negativos para o RIDASCREEN® Norovirus foram de 94,23% (98/104) e 27,27% (21/77), respectivamente (Tabela 04).

Tabela 04: Detecção de NoV em amostras fecais com RT-PCR e RIDASCREEN® Norovirus.

	RT-PCR positivo	RT-PCR negative	TOTAL
RIDASCREEN® Norovirus positivo	98	6	104
RIDASCREEN® Norovirus negativo	56	21	77
TOTAL	154	27	181

RIDASCREEN® Norovirus:

Sensibilidade = 63,64% (98/154)
 Especificidade = 77,78% (21/27)
 Valor preditivo positivo = 94,23%
 Valor preditivo negativo = 27,27%

Após a análise estatística, pode-se observar que a sensibilidade do teste RIDASCREEN® é significativamente maior quando comparado ao teste RIDA®QUICK. Entretanto, não há diferença significativa quanto à especificidade entre os mesmos (Tabela 05).

Tabela 05: Compação da sensibilidade e especificidade dos testes RIDASCREEN® Norovirus 3ª geração e RIDA®QUICK Norovirus.

RT-PCR	N	Sensibilidade (%)			Especificidade (%)		
		RIDASCREEN®	RIDA®QUICK	p-valor	RIDASCREEN®	RIDA®QUICK	p-valor
Positivo	154	63,64	34,42	< 0,00001	36,36	65,58	-----
Negativo	27	22,22	3,70	-----	77,78	96,30	0,07

DISCUSSÃO

As gastroenterites associadas ao NoV acometem indivíduos de todas as idades, em todo o mundo. No Brasil, elas são frequentemente encontradas em crianças abaixo de cinco anos de idade (CASTILHO et al., 2006; GALLIMORE et al., 2004; NAKAGOMI et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008), apesar de infecções por este vírus terem sido detectados em jovens adultos, de forma pioneira na Bahia (CAMPOS et al., 2008). Neste estudo observou-se, independente do meio de diagnóstico utilizado (RIDA[®]QUICK Norovírus, RIDASCREEN[®] Norovirus e RT-PCR), que a infecção por NoV acometeu todas as faixas etárias, sendo a maioria crianças abaixo de cinco anos de idade,

O alto índice de infecção por NoV relacionado às crianças pode estar associado a alguns fatores. Primeiro, as crianças são mais susceptíveis a doenças infecciosas, pois é nessa fase que a imunidade está sendo desenvolvida e, segundo, a preocupação dos pais logo quando as sintomatologias da doença se manifestam, faz com que haja a procura por atendimentos médicos de emergência, elevando o índice de atendimento desta faixa etária.

De acordo com um estudo realizado pelo nosso grupo, foi constatado que as principais sintomatologias observadas nas crianças infectadas por NoV, atendidas no mesmo hospital onde foi realizado este estudo, foram diarreia, vômito e febre (dados ainda não publicados). Embora tenha sido observada uma elevada morbidade nestes pacientes, considerados vulneráveis, não foram constatadas manifestações graves da infecção, nem mortalidade.

Atualmente, com o advento da biologia molecular, uma variedade de técnicas laboratoriais tem sido desenvolvida para o diagnóstico das noroviroses. Entretanto, o método de diagnóstico ideal, ou seja, aquele que seja sensível e específico, de fácil execução e interpretação e que não necessitem de infraestrutura laboratorial e profissionais

especializados, ainda não está disponível. Desta forma, o método de diagnóstico a ser escolhido e utilizado deverá ser aquele que permita um diagnóstico acurado e rápido das noroviroses, principalmente nas localidades onde o acesso a exames laboratoriais mais complexos é limitado.

Os testes imunocromatográficos de fluxo lateral e ELISA para o diagnóstico de NoV têm sido avaliados em vários países, com sensibilidade e especificidade variáveis (DIMITRIADIS; MARSHALL, 2005; BRUINS et al., 2010; BRUGGINK et al., 2011; BATTAGLIOLI et al., 2012; GEGINAT et al., 2012; ROVIDA et al., 2013). No Brasil, são encontrados na literatura alguns estudos relacionados à eficácia dos testes RIDA[®]QUICK Norovirus (imunocromatográfico de fluxo lateral) e RIDASCREEN[®] Norovirus (ELISA), em comparação com o padrão ouro (RT-PCR), demonstrando também resultados amplamente variáveis (KIRBY et al., 2010; MORILLO et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2011).

Segundo Kirby e colaboradores (2010), em um estudo desenvolvido na cidade de Aracajú, Sergipe, Brasil, utilizando a mesma metodologia empregada no nosso estudo, o valor de sensibilidade do teste RIDA[®]QUICK Norovirus, em comparação ao RT-PCR, foi superior (69%) ao resultado apresentado em nosso estudo (34,41%). Por outro lado, em relação à especificidade, o resultado relatado por estes autores (98%) foi semelhante ao apresentado no nosso estudo (96,29%).

Quando analisado o teste RIDASCREEN[®] Norovirus em comparação ao padrão-ouro, a sensibilidade encontrada neste estudo (63,64%) foi semelhante a outros estudos desenvolvidos no Brasil, por Kirby et al. (2010) e Morillo et al. (2011), que revelaram índices de 63% e 61,8%, respectivamente. Entretanto, em relação à especificidade, nossos achados foram inferiores a estes estudos. Na literatura, contudo, há relatos de pior desempenho do teste RIDASCREEN[®] Norovirus, como a sensibilidade de 60% em estudo realizado na

Venezuela (GONZÁLEZ et al., 2006) e 40% na Itália (ROVIDA et al., 2013) e, especificidade de 47% na Austrália (DIMITRIADIS; MARSHALL, 2005).

Ambos os testes (RIDA[®]QUICK Norovirus e RIDASCREEN[®] Norovirus) apresentaram elevados valores preditivos positivos, que se refere a altos valores de positividade detectada pelo padrão ouro (RT-PCR).

Entretanto, quando os testes baseados na detecção do antígeno apresentam resultado negativo, não significa, necessariamente, que não haja infecção por NoV. Isto pode ser explicado pela inabilidade do teste em detectar baixas cargas virais (GONZÁLEZ et al., 2006; TU et al., 2008), dificuldade do teste em detectar os antígenos de NoV devido à sua diversidade antigênica (BRUIN et al., 2006) e pela excreção intermitente do vírus (TU et al., 2008). Assim, todos estes fatores levados em consideração conjuntamente, podem justificar as diferenças dos índices de sensibilidade encontrados nos diferentes estudos.

Independente do método de diagnóstico utilizado para detectar as norovirozes, o tratamento dos pacientes infectados consiste em tratamentos paliativos, como a utilização de hidratação e reposição de eletrólitos por meio de sais orais ou soro caseiro e hidratação endovenosa nos casos mais graves, pois, até o momento, não há um tratamento com antiviral consolidado. Porém, é de fundamental importância a rápida detecção do NoV, pois ele é um vírus altamente infeccioso e, conseqüentemente, a interrupção de sua transmissão é a primeira estratégia para a prevenção.

Por fim, os resultados obtidos neste estudo permitem recomendar a utilização do teste ELISA na investigação em grande número de amostras de forma econômica e rápida, evitando assim a rápida propagação das norovirozes e prescrição errônea de terapêutica, como nos casos de utilização de antibióticos. Porém, para um diagnóstico individual preciso, sugerimos a realização do RT-PCR para a confirmação dos falsos negativos.

AGRADECIMENTO

Ao apoio financeiro concedido pela Fundação de Apoio à Pesquisa do estado da Bahia (FAPESB) e ao grupo médico e técnico Hospital Aliança.

REFERÊNCIAS

AMBERT-BALAY, K.; POTHIER, P. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for detection of norovirus in faecal samples. *Journal of Clinical Virology*, v.56, p.278-282, 2013.

APOSTEL, F.; DRESSLER, D.; LEIDINGER, H.; FISCHER, R.; SANDER, P. Rida[®] Quick Norovirus: a new dimension for norovirus detection. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.15 (Suppl 4), p.123, 2009.

ARAGÃO, G. C.; OLIVEIRA, D. S.; SANTOS, M. C.; MASCARENHAS, J. D. P.; OLIVEIRA, C. S.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. *Rev. Pan-Amaz. Saúde*, v.1, p.149-58, 2009.

BATTAGLIOLI, G.; NAZARIAN, E. J.; LAMSON, D.; MUSSER, K. A.; GEORGE, K. St. Evaluation of RIDAQuick norovirus immunochromatographic test kit. *Journal of Clinical Virology*, v.53, p.262-264, 2012.

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

BRUGGINK, L. D.; WITLOX, K. J.; SAMEER, R.; CATTON, M. G.; MARSHALL, J. A. Evaluation of the RIDA[®] QUICK immunochromatographic norovirus detection assay using specimens from Australian gastroenteritis incidents. *Journal of Virological Methods*, v.173, p.121-126, 2011.

BRUIN, E.; DUIZER, E.; VENNEMA, H.; KOOPMANS, M. P. G. Diagnosis of norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, v.137, p.259-264, 2006.

BRUINS, M. J.; WOLFHAGEN, M. J. H. M.; SCHIRM, J.; RUIJS, G. J. H. M. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of norovirus in stool samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.29, p.741-743, 2010.

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

CASTILHO, J. G.; MUNFORD, V.; RESQUE, H. R.; FAGUNDES-NETO, U.; VINJÉ, J.; RÁCZ, M. L. Genetic diversity of Norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo state, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, p.3947-3953, 2006.

DIMITRIADIS, A.; MARSHALL, J. A. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for detection of norovirus in outbreaks specimens. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.*, v.24, p.615-18, 2005.

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

EGINAT, G.; KAISER, D.; SCHREMPF, S. Evaluation of third-generation ELISA and rapid immunochromatographic assay for the detection of norovirus infection in fecal samples from inpatients of a German tertiary care hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.31, p.733-737, 2012.

GLASS, R. I.; PARASHAR, U. D.; ESTES, M. K. Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.*, v.361, p.1776-85, 2009.

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

GREEN J.; GALLIMORE, C. I.; NORCOTT, J. P.; LEWIS, D.; BROWN, D. W. G. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV – associated gastroenteritis. *J. Med. Virol.*, v. 47, p. 392-398, 1995.

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

HAWASS, N. E. D. Comparing the Sensitivities and Specificities of Two Diagnostic Procedures Performed on the Same Group of Patients. *Br. J. Radiol.*, v.70, p.360–366, 1997.

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

KIRBY, A.; GURGEL, R. Q.; DOVE, W.; VIEIRA, S. C.; CUNLIFFE, N. A.; CUEVAS, L. E. An evaluation of the RIDASCREEN and IDEIA enzyme immunoassays and the RIDAQUICK immunochromatographic test for the detection of norovirus in faecal specimens. *Journal of Clinical Virology*, v.49, p.254-257, 2010.

KOEK, A. G.; BOVÉE, L. P. M. J.; Van den HOEK, J. A. R.; BOS, A. J.; BRUISTEN, S. M. Additional value of typing Noroviruses in gastroenteritis outbreaks in Amsterdam, The Netherlands. *Journal of Clinical Virology*, v.35, p.167-172, 2006.

LEVETT, P. N.; GU, M.; LUAN, B.; FEARON, M.; STUBBERFIELD, J.; JAMIESON, F.; PETRIC, M. Longitudinal study of molecular epidemiology of small round- Structured Viruses in a Pediatric Population. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, p.1497-1501, 1996.

MORILLO, S. G.; CILLI, A.; CARMONA, R. C. C.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Identification and molecular characterization of Norovirus in São Paulo state, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.39, p.619-322, 2008.

MORILLO, S. G.; LUCHS, A.; CILLI, A.; RIBEIRO, C. D.; CALUX, S. J.; CARMONA, R. C. C.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Norovirus 3rd generation kit: na improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection. *Journal of Virological Methods*, v.173, p.13-16, 2011.

NAKAGOMI, T.; CORREIA, J. B.; NAKAGOMI, O.; MONTENEGRO, F. M. U.; CUEVAS, L. E.; CUNLIFFE, N. A.; HART, C. A. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity in comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch. Virol.*, v.153, p.957-960, 2008.

OKITSU-NEGISHI, S.; OKAME, M.; SHIMIZU, Y.; PHAN, T. G.; TOMARU, T.; KAMIJO, S.; SATO, T.; YAGYU, F.; MÜLLER, W. E. G.; USHIJIMA, H. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay kit. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, p.3784-86, 2006.

POMBUBPA, K.; KITTIGUL, L. Assessment of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of norovirus gastroenteritis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.31, p.2379-2383, 2012.

RIBEIRO, L. R.; GIUBERTI, R. S. O.; BARREIRA, D. M. P. G.; SAICK, K. W.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SPANO, L. C. Hospitalization due to norovirus genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.103, p.201-206, 2008.

ROVIDA, F.; CAMPANINI, G.; SARASINI, A.; ADZASEHOUN, K. M. G.; PIRALLA, A.; BALDANTI, F. Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.75, p.110-111, 2013.

SCHREIER, E.; DÖRING, F.; KÖNKEL, U. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Arch. Virol.*, v.145, p.443-453, 2000.

SIQUEIRA, J. A.; LINHARES, A. C.; OLIVEIRA, D. S.; SOARES, L. S.; LUCENA, M. S. S.; WANZELLER, A. L. M.; MASCARENHAS, J. D. P.; GABBAY, Y. B. Evaluation of third-generation RIDASCREEN enzyme immunoassay for the detection of norovirus antigens in stool samples of hospitalized children in Belém, Pará, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.71, n.4, p.391-395, 2011.

StatSoft Inc. STATISTICA (data analysis software system). Version 8.0, 2007.

TAMHANE, A. Matched-Sample Analysis: Sensitivity, Specificity, and P Values. *Clin. Infect. Dis.*, v.46, p.474-475, 2008.

TU, E. T. V.; BULL, R. A.; KIM, M. J.; MELVER, C. J.; HERON, L.; RAWLINSON, W. D.; WHITE, P. A. Norovirus excretion in an aged-care setting. *Journal of Clinical Microbiology*, v.46, p.2119-21, 2008.

VINJÉ, J.; KOOPMANS, M. P. G. Molecular detection and epidemiology of small round structured viruses in outbreak of gastroenteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.*, V.174, P.610-15, 1996.

WIDDOWSON, M-A.; MONROE, S. S.; GLASS, R. I. Are noroviruses emerging? *Emerging Infectious Diseases*, v.11, p.735-737, 2005.

WHO. World Health Organization. State of the art of new vaccines: research and development. 2009. p.1-25: Diarrhoeal diseases. Available from: http://www.who.int/vaccine_research/documents/Dip%20814.pdf. [cited 2013 feb]

ZHENG, D-P.; ANDO, T.; FANKHAUSER, R. L.; BEARD, R. S.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, v.346, p.312-23, 2006.

8 MANUSCRITO 4

Archives of Virology
Genealogy of circulating Norovirus in Brazil
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Genealogy of circulating Norovirus in Brazil
Article Type:	Brief Report
Corresponding Author:	Gubio Soares Campos, PhD University of Bahia Salvador, BA BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of Bahia
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Fabiana Lopes Paula, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Fabiana Lopes Paula, M.D. Sílvia Inês Sardi, Ph.D. Flora Maria de Campos Fernandes, Ph.D. Marcus Welby Borges, Ph.D. Dellane Martins Tigre, M.D. Camila Fonseca Lopes Brandão, Ph.D. Julianna Alves Torres, M.D. Cláudio José de Freitas Brandão, M.D. Gubio Soares Campos, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Norovirus (NoV) is an important etiologic agent of acute gastroenteritis in children and adults both in Brazil and worldwide. In this study, stool samples (n = 181) collected in the state of Bahia, Brazil, were subjected to RT-PCR for the detection of NoV. NoV infection was identified in 51.30% (79/154) and 31.17% (48/154) of samples from children and adults, respectively. The strains, isolated in this study and from other regions of Brazil, subjected to phylogenetic analysis show the predominance of NoV GI.4 in Brazil, revealing also the presence of variant strains and possibly of recombinant strains.

Cover Letter

Brazil, July 2013

Editor-in-Chief: Marc H. V. Van Regenmortel
Archives of Virology

Respect Sir,

I am GÚBIO SOARES CAMPOS and as a corresponding author, I would like to submit the manuscript Genealogy of circulating Norovirus in Brazil for publication in Archives of Virology as a Brief Report.

Norovirus (NoV) is an important etiologic agent of acute gastroenteritis in children and adults both in Brazil and worldwide. In this study, stool samples (n = 181) collected in the state of Bahia, Brazil, were subjected to RT-PCR for the detection of NoV. NoV infection was identified in 51.30% (79/154) and 31.17% (48/154) of samples from children and adults, respectively. The strains, isolated in this study and from other regions of Brazil, subjected to phylogenetic analysis show the predominance of NoV GII.4 in Brazil, revealing also the presence of variant strains and possibly of recombinant strains.

I undertake that human study was performed after the prior approval of institutional ethical committee and this manuscript has not been published or considered for publication by any other journal or elsewhere.

Kindly consider the manuscript for publication in your journal.

Gúbio Soares Campos

Laboratory of Virology
Department of Bio-interaction
Institute of Health Science
Universidade Federal da Bahia
Salvador, Bahia, Brazil

Manuscript

[Click here to download Manuscript: Text 10.07.14.doc](#)

[Click here to view linked References](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

Norovirus (NoV) is an important etiologic agent of acute gastroenteritis in children and adults both in Brazil and worldwide. In this study, stool samples (n = 181) collected in the state of Bahia, Brazil, were subjected to RT-PCR for the detection of NoV. NoV infection was identified in 51.30% (79/154) and 31.17% (48/154) of samples from children and adults, respectively. The strains, isolated in this study and from other regions of Brazil, subjected to phylogenetic analysis show the predominance of NoV GII.4 in Brazil, revealing also the presence of variant strains and possibly of recombinant strains.

Title page:

Genealogy of circulating Norovirus in Brazil

Author contact information: Gúbio Soares Campos

Laboratory of Virology

Department of Bio-interaction

Institute of Health Science

Universidade Federal da Bahia

Av. Reitor Miguel Calmon SN

Vale do Canela

40.110-100

Salvador, Bahia, Brazil

Introduction

Norovirus (NoV) belonging to *Caliciviridae* family is recognized as a leading agents of acute nonbacterial gastroenteritis [14, 17, 20]. NoV infects individuals of all ages, especially children and the elderly, and rarely occurs with other viruses that cause gastroenteritis. In children, NoV is considered the second predominant aetiological agent of diarrhea after rotavirus, while it is the most common cause of gastroenteritis outbreaks in the elderly [18, 19].

NoV is a non-enveloped virus with icosahedral capsid morphology whose viral genome is a positive-stranded RNA of approximately 7.5 kb in length, organized into three open reading frames (ORF1-3). The ORF1 encodes a non-structural polyprotein, including RNA-dependent RNA polymerase, a highly conserved region used for the diagnosis and identification of NoV. ORF2 and ORF3 encode the major capsid protein (VP1) and the minor structural protein (VP2), respectively. Certain authors postulate that genetic recombination can occur in the overlapping region between ORF1 and ORF2, which could potentially be related to NoV virulence [6, 10, 13, 19, 22, 38].

The NoV can be classified into five genogroups (GI-GV). Three of these genogroups (GI, GII and GIV) occur in human infections; however, most strains belong to GI and GII. The genogroups can be further subclassified into genotypes, with 8 genotypes found in GI (GI.1-GI.8) and 21 in GII (GII.1-GII.21), and variants (sub-genotypes)

1
2
3
4 based on the sequence diversity [9, 26]. The presence of GII variants has been detected in the region D (ORF2) of
5 the viral capsid, and some authors postulate that it could be a possible cause of the predominance of GII.4
6 worldwide [1, 2, 11, 13, 28, 32, 35].

7
8 NoV was first reported in Brazil in 1993, and since then, the presence of GI and GII has been reported in
9 several regions of the country, namely, in the North, Midwest, Southeast and Northeast [3, 4, 7, 11, 14, 33, 37].
10 NoV is an etiologic agent frequently reported in gastrointestinal disorders in Brazil; however, there is currently no
11 phylogenetic study of exclusively Brazilian strains. Therefore, this study proposes an assessment of the gene profile
12 and genetic relationship among circulating strains in Brazil.

13
14 A total of 181 stool samples were collected from patients from one month to 88 years old with symptoms of
15 gastroenteritis, assisted at Aliança Hospital in the city of Salvador, Bahia, between May and July 2012.

16
17 Viral RNA was extracted from 140µl of 10% stool supernatant using the QIAmp viral RNA kit (QIAGEN,
18 Germany), according to the manufacturer's instructions. The extracted RNA (8µl) was subjected to reverse
19 transcription (RT) using the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, USA) following the manufacturer's
20 protocol, with primers CAL-32 (5'-ATGAATATGAATGAGGATGG-3') [31] and MO3-N (5'-
21 TCAGATGGGTCTTCATGATTGG-3') [25], for targeting the RNA-dependent RNA polymerase gene (ORF1) and
22 result in a cDNA of 638 bp.

23
24 The cDNA was then submitted to nucleic acid amplification for NoV detection in all samples. To
25 investigate NoV infection, polymerase chain reaction (PCR) was performed using PCR Super Mix Kit (Invitrogen,
26 USA) following the manufacturer's protocol with two primers JV-12 (5'-ATACCACTATGATGCAGATTA-3')
27 [36] and ACAL-36 (5'-GACAAAACAGAAGGACCAAT-3') [31] resulting in a final amplification product of 428
28 bp. The final volume of the reaction was 50µl and the amplification was performed as described by Koek et al. [25].

29
30 Subsequently, the PCR products were subjected to horizontal electrophoresis in 2% agarose gel and, after
31 the electrophoresis the gel was stained with ethidium bromide (1µg/mL), to visualize the fragments.

32
33 The PCR amplicons were purified with a QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) according
34 to the manufacturer's instructions. The purified DNA was subjected to a sequencing reaction, in both directions,
35 using a "Big Dye Terminator[®] v1.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, USA).

36
37 From all samples screened for Norovirus, using a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-
38 PCR), three of them were submitted for gene sequencing. The sequences obtained in this study were aligned, edited
39 using BioEdit Sequence Editor 7.0 software [21] and compared with other nucleotide sequences (RNA-dependent
40 RNA polymerase region – ORF1) from Brazilian strains available in GenBank. Phylogenetic tree were structured by
41 the Maximum Likelihood method based on the Kimura two-parameter model [24] using the Mega version 6
42 software package [34]. Confidence values of internal nodes were calculated by bootstrap analyses using 1,000
43 replicates.

44
45 The nucleotide sequences determined in this study have been deposited in GenBank database and assigned
46 the accession numbers: KF265495.1, KF265496.1 and KF265497.1.

47
48 NoV was detected in 154 of 181 (85.08%) stool samples of gastroenteritis patients by RT-PCR. This result
49 shows a significant increase in the rate of NoV infection in Bahia [7, 37] and is considerably higher than in other
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 studies conducted in Brazil, such as in the states of Rio de Janeiro and Porto Alegre, which reported prevalence
5 between 13 and 35% [12, 16].
6

7 NoV is considered an important etiologic agent in viral gastroenteritis in adults. However, despite its
8 prominence in adults, few studies target this population, possibly because NoV affects children, who exhibit more
9 severe or serious clinical conditions, thus leading to greater attention on this age group [12, 15, 27, 30]. In this study,
10 the collection of samples of gastroenteritis patients, regardless of age, shows high positivity in adults (≥ 22 years of
11 age) (31.17%-48-/154) (Table 1). This profile has been found in previous studies in Bahia and differs from reports in
12 other states where the incidence of NoV infection in this age group is seldom reported [7, 12]. Despite this
13 observation, NoV is still an important etiologic agent of acute gastroenteritis in children as shown in the present
14 study (Table 1). There is high frequency of NoV gastroenteritis reported in children under 5 years of age (51.30%-
15 79/154) (Table 1) and more specifically among children between 6 months and 3 years of age (83.54%-66/79).
16
17
18
19
20
21

22 **Table 1.** Distribution of positive samples analyzed by age groups
23
24

25 Several states in Brazil reported the presence of NoV based upon sequence data of NoV strains registered in
26 GenBank. The genetic relationship among of these strains with others characterized in the present study was
27 established by phylogenetic analysis.
28
29

30 Fig. 1 shows the phylogenetic tree based on the K2+G model (Kimura 2-parameter + Gamma distribution)
31 of nucleotide substitution and similarity value - InL= -662.645. Based on this model, the phylogenetic tree revealed
32 three distinct phylogenetic groups. The GI group was used as an outgroup. The strains of the GII group displayed
33 divergences in sequence alignment which led to the separation into two distinct groups - GII (A) and GII (B). One
34 hypothesis suggests the presence of genetic recombination or variants in the Brazilian strains characterized as GII,
35 which hampers a better alignment.
36
37
38

39 Fig. 1 shows, in GII (a) group, NoV strains originating from the states of Bahia, Pará, Rio de Janeiro and
40 São Paulo, collected between 1995 and 2009, clustered as GII [8, 11, 33, 37]. In this clade, the strains
41 Para/2009/JQ683760.1 and Para/2008/JQ683756.1 from the state of Pará and Sao Paulo/2010/JQ361661.1 from the
42 state of São Paulo are GII.4; and the genotypes of other strains, such as Bahia/2001/EU155116.1, Sao
43 Paulo/2005/EF442185.1, Sao Paulo/1998/DQ386961.1, Sao Paulo/1999/DQ386970.1 and Sao
44 Paulo/1995/EF442179.1, have not been characterized. However, the presence of a significant bootstrap in the clade
45 containing strains previously identified as GII.4 suggests that all other strains also belong to GII.4. Nevertheless,
46 two strains (Para/2008/JQ683764.1 and Para/2009/JQ683765.1) originating from the state of Pará grouped in a
47 separate branch, indicated a potential genetic recombination of the genes for RNA-dependent RNA polymerase
48 GII.b-like and capsid GII.3-like, as suggested by some authors [6, 29, 33, 35]. Certain strains of this clade, such as
49 Sao Paulo/2004/EF442181.1, Sao Paulo/1997/DQ386980.1 and Sao Paulo/1996/DQ386947.1 from the state of São
50 Paulo, revealed similarities between their nucleotide sequences, a clustering profile similar to the strains
51 Para/2009/JQ683765.1 and Para/2008/JQ683764.1, described as recombinant NoV strains. However, more in-depth
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 studies are required to confirm the presence of GII variants or genetic recombination, specifically analyzing the
5 region D of the viral capsid (ORF2) and the open reading frame ORF1/ORF2 overlap [5, 6, 28].
6

7 The GII (b) group comprises the strains Para/1993/FJ481910.1 and Para/2003/GU012316.1 identified in
8 Pará; Bahia/2006/EU494651.1, Bahia/2009/KF307752.1-KF307754.1 and Bahia/2010/KF307755.1-KF307757.1,
9 identified in Bahia; and the strains Bahia/2012/KF265495.1-KF265497.1, obtained in the present study in the year
10 2012. This group shows a quite different behavior compared with the GII (a) group. The strains identified in Bahia
11 formed a homogeneous group according the high similarity of the nucleotide sequences and appeared to be closely
12 related to the GII.4 strain (Bahia/2006/EU494651.1). Moreover, the strain from Pará (Para/2003/GU012316.1)
13 characterized as GII.4, also clustered within this group, reinforcing the hypothesis that all strains belonging to this
14 group are GII.4.
15
16
17
18

19 The present study shows that there was a change in the genetic profile of circulating strains in Bahia, given
20 that GI and GII strains were detected in 2001 while, after five years, only strains of the GII genogroup were detected
21 [7, 37]. GII.4 strains have been predominant in Bahia since 2006, and it is suggested that they are similar to those
22 circulating in the state of Pará (Para/1993/FJ481910.1 and Para/2003/GU012316.1), as shown by its clustering in a
23 highly supported clade (significant bootstrap).
24
25
26

27 In conclusion, the present study shows that GII.4 is the predominant genotype in several Brazilian strains of
28 NoV, as observed in worldwide [7, 10, 23]. Although the GII.4 is considered the main genotype circulating in
29 Brazil, future studies are required to identification possible genotype variants or genetic recombination by analysis
30 of the nucleotide sequences of capsid region (ORF2) and comparisons between phylogenetic analysis of ORF1 and
31 ORF2. Finally, the development of a national database of Brazilian strains of NoV could provide greater insight into
32 the virus and its epidemiological impact on the population, as seen in the European countries that have the NoroNet,
33 a database who share surveillance and research data on Norovirus.
34
35
36
37
38

39 **Fig. 1.** Phylogenetic tree based on a partial fragment of the RNA-dependent RNA polymerase gene on human
40 Norovirus GI and GII. Strains denomination: state of origin/year of collection/GenBank access number. The strains
41 detected in this study are presented in bold.
42
43
44

45 **Acknowledgements:** This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).
46
47

48 **Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.
49
50

51 References

- 52 1. Ahmed SM, Lopman BA, Levy K (2013) A systematic review and meta-analysis of the global seasonality
53 of norovirus. PLoS One 8:e75922.
- 54 2. Aragão GC, Mascarenhas JDP, Kaiano JHL, Lucena MSS, Siqueira JAM, Fumian TM, Hernandez JM,
55 Oliveira CS, Oliveira DS, Aratijo EC, Soares LS, Linhares AC, Gabbay YB (2013) Norovirus diversity in
56 diarrheic children from na african-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. PLoS One 8:e56608.
- 57 3. Aragão GC, Oliveira DS, Santos MC, Mascarenhas JDP, Oliveira CS, Linhares AC, Gabbay YB (2010)
58 Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus with acute gastroenteritis from Belém,
59 Pará, Brazil. Rev Pan-Amaz Saúde 1:149-158.
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

4. Borges AMT, Teixeira JMS, Costa PSS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Carvalho e Franco R, Brito WME, Leite JPG, Cardoso DDP (2006) Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:721-724.
5. Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA (2005) Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis* 11:1079-1085.
6. Bull RA, Tanaka MM, White PA (2007) Norovirus recombination. *J Gen Virol* 88:3347-3359.
7. Campos GS, Moreau VH, Bandeira A, Barberino G, Almeida PF, Amador DM, Lima MO, Sardi SI (2008) Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. *Arch Virol* 153:1125-1129.
8. Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinjé J, Rácz ML (2006) Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo state, Brazil. *J Clin Microbiol* 44:3947-3953.
9. CDC (2011) Updated norovirus outbreak and management and disease prevention guidelines. *MMWR* 60:1-15.
10. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS (2008) Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Reviews* 225:190-211.
11. Ferreira MSR, Garcia RCC, Xavier MPTP, Ribeiro RL, Assis RM, Mota MCMS, Leite JPG, Miagostovich MP, Oliveira SA (2012) Genotyping of gastroenteric viruses in hospitalised children: first report of norovirus GII.21 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:1064-1067.
12. Ferreira MSR, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MPTP, Fioretti JM, Andrade J, Volotão EM, Rocha M, Leite JPG, Miagostovich MP (2010) Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005-2008. *J Med Virol* 82:1442-1448.
13. Frankhauser FL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresse JS, Parashar UD, Ando T, Glass RI (2002) Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 186:1-7.
14. Gallimore CI, Barreiros MAB, Brown DWG, Nascimento JP, Leite JPG (2004) Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 37:321-326.
15. Gao Y, Jin M, Cong X, Duan Z, Li HY, Guo X, Zuo Y, Zhang Y, Zhang Y, Wei L (2011) Clinical and molecular epidemiologic analyses of norovirus-associated sporadic gastroenteritis in adults from Beijing, China. *J Med Virol* 83:1078-1085.
16. Georgiadis S, Pilger DA, Pereira F, Cantarelli VV (2010) Molecular evaluation of norovirus in patients with acute gastroenteritis. *Rev Soc Bras Med Trop* 43:277-280.
17. Giammanco GM, Rotolo V, Medici MC, Tummofo F, Bonura F, Chezzi C, Martella V, Grazia SD (2012) Recombinant norovirus GII.g/GII.12 gastroenteritis in children. *Infect Genet Evol* 12:169-74.
18. Glass RI, Noel J, Ando T, Frankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresse JS, Monroe SS (2000) The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2:254-261.
19. Glass RI, Parashar UD, Estes MK (2009) Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 361:1776-1785.
20. Green KY (2007) Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM (ed) *Fields Virology*, 5th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp949-980.
21. Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
22. Hardy ME (2005) Norovirus protein structure and function. *Fems Microbiol Lett* 253:1-8.
23. Hutson AM, Atmar RL, Estes MK (2004) Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* 12:279-287.
24. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120.
25. Koek AG, Bovée LPMJ, Van den Hoek JAR, Bos AJ, Bruisten SM (2006) Additional value of typing Noroviruses in gastroenteritis outbreaks in Amsterdam, The Netherlands. *J Clin Virol* 35:167-172.
26. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort HVD, Peñaranda S, Oberste MS, Vinjé J, Koopmans M (2011) An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol* 51:121-125.
27. Liu LJ, Liu W, Liu YX, Xiao HJ, Jia N, Liu G, Tong YG, Co WC (2010) Identification of norovirus as the top enteric viruses detected in adult cases with acute gastroenteritis. *Am J Trop Med Hyg* 82:717-722.
28. Mattison K, Grudeski E, Auk B, Charest H, Drewa SJ, Fritzing A, Gregoricus N, Hayward S, Houde A, Lee BE, Pang XL, Wong J, Booth TF, Vinjé J (2009) Molecular comparison of two norovirus ORF2-based genotyping protocols. *J Clin Microbiol* 42:3927-3932.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

29. Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Takashi S, Okitsu S, Ushijima H (2007) Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *J Med Virol* 79:1388-1400.
30. Podkolzin AT, Fenske EB, Abramychcheva NY, Shipulin GA, Sagalova OI, Mazepa VN, Ivanova GN, Semena AV, Tagirova ZG, Alekseeva MN, Molochny VP, Parashar UD, Vinjé J, Maleev VV, Glass RI, Pokrovsky VI (2009) Hospital-based surveillance of rotavirus and other viral agents of diarrhea in children and adults in Russia, 2005-2007. *J Infect Dis* 200:S228-233.
31. Schreier E, Döring F, Kônkel U (2000) Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Arch Virol* 145:443-453.
32. Silva LD, Rodrigues EL, Lucena MSS, Lima ICG, Oliveira DS, Soares LS, Mascarenhas JDP, Linhares AC, Gabbay YB (2013) Detection of the pandemic norovirus variant GII.4 Sydney 2012 in Rio Branco, state of Acre, northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1:1-2.
33. Siqueira JAM, Linhares AC, Carvalho TCN, Aragão GC, Oliveira DS, Santos MC, Sousa MS, Justino MCA, Mascarenhas JDP, Gabbay YB (2013) Norovirus infection in children admitted to hospital for acute gastroenteritis in Belém, Pará, Northern Brazil. *J Med Virol* 85:737-744.
34. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) Mega 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729.
35. Tu ETV, Bull RA, Greening GE, Hewitt J, Lyon MJ, Marshall JA, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA (2008) Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of Norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. *Clin Infect Dis* 46:413-420.
36. Vinjé J, Koopmans MPG (1996) Molecular detection and epidemiology of small round structured viruses in outbreak of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 174:610-615.
37. Xavier MPTP, Oliveira SA, Ferreira MSR, Victoria M, Miranda V, Silva MFM, Strina A, Barreto ML, Miagostovicht MP, Leite JPG (2009) Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban Center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res* 42:438-444.
38. Zheng DP, Ando T, Frankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS (2006) Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virol J* 346:312-323.

Figure

[Click here to download Figure: Figure 1.doc](#)

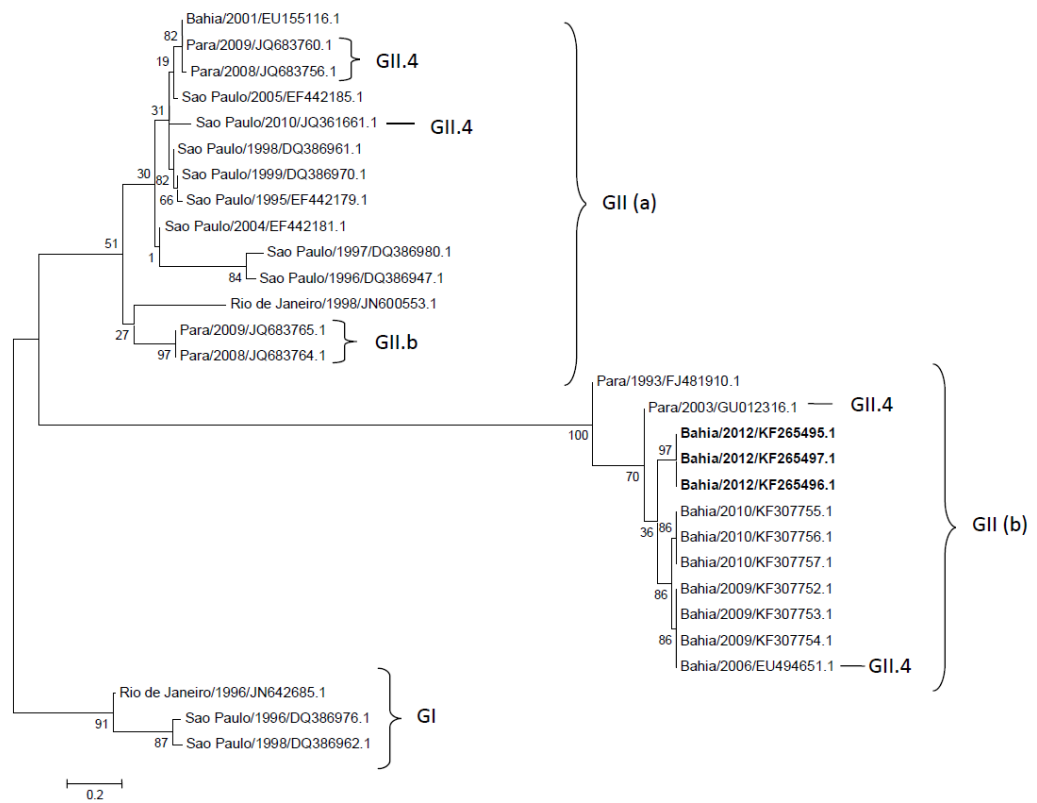


Figure 1. Phylogenetic tree based on a partial fragment of the RNA-dependent RNA polymerase gene on human Norovirus GI and GII. Strains denomination: state of origin/year of collection/GenBank access number. The strains detected in this study are presented in bold.

Table

Table 1. Distribution of positive samples analyzed by age groups

Age range (years)	N ^o	(%)
0-5	79	(51.3)
6-15	16	(10.39)
16-21	11	(7.14)
22-59	31	(20.13)
Above 60	17	(11.04)
Total	154	(100)

9 CONCLUSÕES

- As infecções virais são mais frequentes quando comparadas às bacterianas;
- O teste ELISA pode ser recomendado na investigação de grande número de amostras como forma econômica e rápida;
- A infecção por NoV tem sido observada com alta frequência em crianças, porém os adultos também apresentam alto índice de positividade;
- A frequência da infecção por NoV tem aumentado ao longo dos anos, na cidade de Salvador;
- O GII.4 é um genótipo predominante em muitas cepas brasileiras de NoV, inclusive nas circulantes em Salvador.

10 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Desenvolvimento de estudos sobre infecções mistas;
- Desenvolvimento de Kits nacionais para a detecção do NoV em amostras de fezes pelo método ELISA;
- Desenvolvimento de estudos para a detecção de possíveis variantes de GII.4 e/ou identificação de recombinações gênicas;
- Desenvolvimento de um banco de dados nacional de cepas de NoV brasileiras para contribuir com os estudos epidemiológicos e moleculares do vírus.

ANEXO 1

PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE SALVADOR COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Salvador, 09 de agosto de 2010

Gubio Campos Soares
Carla Jaqueline Silva Sampaio

REF: Submissão de Projeto

Projeto: "Avaliação da distribuição sazonal e caracterização molecular do Norovírus Humano em pacientes hospitalizados com gastroenterite aguda em Salvador-Bahia"

FR: 345422

Protocolo nº: 04.11.12

Prezados Pesquisadores,

Apraz-nos comunicar que o seu projeto intitulado "Avaliação da distribuição sazonal e caracterização molecular do Norovírus Humano em pacientes hospitalizados com gastroenterite aguda em Salvador-Bahia" foi APROVADO pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Salvador em Reunião Ordinária realizada em 02 de agosto de 2010.

Lembramos a V.S^a. da necessidade de enviar relatórios periódicos trimestrais acerca do progresso do referido projeto para este CEP, bem como o envio do relatório final consubstanciado e documentado conforme apresentado no cronograma de seu projeto. Informamos ainda, que em se tratando de projetos de conclusão de curso, monografias, dissertações ou teses, uma cópia do manuscrito final deverá ser encaminhada para nossos registros, bem como cópias dos artigos publicados decorrentes da pesquisa realizada sob nossa aprovação.

Na certeza do cumprimento ético de suas atividades de pesquisa, desejamos a realização de um ótimo trabalho e colocamo-nos à sua disposição para esclarecer quaisquer dúvidas ou questionamentos que se façam pertinentes durante a duração do estudo aprovado.

Cordialmente,


Prof. Dr. Francisco Kelmo, PhD
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Salvador

ANEXO 2

**FOTODOCUMENTAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS PELO RT-PCR
VISUALIZADOS EM GEL DE AGAROSE A 2%.**

