

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DETECÇÃO DO NOROVÍRUS GII EM CRIANÇAS DE ATÉ 5 ANOS DE IDADE NO
MUNICÍPIO DE GUARAPUAVA-PR

LENI MACEDO SEMAAN

GUARAPUAVA

2014

Leni Macedo Semaan

**DETECÇÃO DO NOROVÍRUS GII EM CRIANÇAS DE ATÉ 5 ANOS NO
MUNICÍPIO DE GUARAPUAVA-PR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicada a Farmácia, da UNICENTRO-PR.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Carraro

Guarapuava

2014

*“Deus não escolhe os
capacitados, capacita os
escolhidos.”*

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu Senhor e protetor sempre presente em minha vida, guiando-me pelos caminhos a serem seguidos.

Ao meu orientador Emerson Carraro por confiar a mim este trabalho e dar-me a oportunidade de fazer parte da 1ª equipe de alunos do laboratório de Virologia da Unicentro. Por todos os momentos que precisei de sua orientação, que aliás não foram poucos, sempre esteve presente e disposto a me ajudar com muito respeito, paciência e compreensão às minhas limitações. Confesso que foi o grande responsável por resgatar a minha auto estima profissional, pois depois de muito tempo longe dos bancos acadêmicos, não foi fácil, mas sempre me incentivou, mostrando que nunca é tarde para recomeçar.

Às minhas colegas (inicialmente) e amigas (atualmente) de laboratório Juliane e Veronica que sempre estiveram ao meu lado nesta caminhada, ajudando-me nas minhas dificuldades, contem sempre comigo.

A todos os meus amigos do mestrado, pois todos tiveram uma parcela de contribuição neste trabalho por uma palavra ou conselho.

Aos professores e à coordenação do programa de mestrado em Ciências Farmacêuticas pelos conhecimentos repassados e pelo bom convívio durante este período.

Aos meus pais Sr. Lauro e Sra. Tide pela oportunidade do estudo, pelos bons exemplos e dedicação, sem eles tudo teria sido mais difícil.

Aos meus filhos Karime e Samir por compreenderem meus momentos de ausência e de estresse, que muitas vezes deixei transparecer.

Ao meu marido Samir, companheiro para todas as horas, que sempre esteve ao meu lado incentivando-me e apoiando-me emocional e financeiramente para que concluísse este trabalho, o meu muito obrigada. E tenha a certeza que o meu respeito, e amor por você continuará até que a morte nos separe.

Ao Dr José Paulo Gagliardi Leite do Laboratório FioCruz por ter nos cedido as amostras controles.

Ao prof. Paulo Roberto da Costa por deixar as portas abertas do laboratório de Biologia Molecular quando precisamos e a Bruna Saviatto pela atenção disponibilizada e conhecimentos repassados.

À Fundação Araucária pelo financiamento do projeto, à todas as crianças que participaram da pesquisa e aos pais por permitirem participar deste estudo.

RESUMO

Por muito tempo o diagnóstico do Norovírus (NoV) ficou prejudicado por não haver um modelo experimental animal e por não ser detectável em cultura de células. Mas com os avanços das técnicas moleculares eles passaram a ter grande importância dentro das gastroenterites. Estudos mais recentes relatam que, após o desenvolvimento da vacina contra o Rotavírus, o NoV vem se destacando como principal agente etiológico nas gastroenterites. Poucos estudos no Brasil investigaram a circulação do NoV, sendo a maioria deles realizados em ambientes fechados (hospitais, asilos e creches), e poucos estudos relatam sua circulação na comunidade. Este estudo teve como objetivo mostrar a circulação deste vírus em crianças da comunidade atendidas no sistema de saúde do município de Guarapuava-PR, no período de março de 2011 a fevereiro de 2012. Foram coletadas 120 amostras de fezes de crianças de até 5 anos de idade e analisadas pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) específica para NoV GII, pois este é o genótipo que mais se destaca no Brasil e no mundo. O ensaio de RT-PCR foi otimizado para obter o maior rendimento e aplicado nas 120 amostras coletadas, sendo que 19 foram positivas para NoV (15,83%). Os meses de maior circulação foram setembro e outubro (2011), sugerindo a possibilidade de surto neste período. Estes resultados apontam para a circulação de NoV em crianças na comunidade, como agente causador de gastroenterites, sugerindo que este agente passe a ser considerado no diagnóstico diferencial e na instituição de medidas de controle da transmissão.

Palavras chave: Gastroenterite, Norovírus, Diarreia.

ABSTRACT

For a long time, the Norovirus diagnosis (NoV) was impaired by the absence of an experimental animal model, and because it isn't detectable in cell culture. Although, with advances in molecular techniques, the NoV has gained great importance in the gastroenteritis. Studies report that, after the development of the vaccine against rotavirus, the NoV has been emerging as the main etiological agent. Few studies in Brazil have investigated the circulation of NoV, and most of them are in closed places (hospitals, nursing homes, and day care centers), and few of them report the circulation in the community. This study aimed to show the circulation of this virus in children enrolled in the public health system of Guarapuava-PR, from March 2011 to February 2012. It was collected 120 fecal samples from children up to 5 years old, analyzed by polymerase chain reaction (RT-PCR) specific for NoV GII, as this is the genotype that stands out most in Brazil and in the world. Optimized RT-PCR assay and apply to 120 collected samples, with NoV detected in 19, accounting for 15,83%. The months with the largest circulation were September and October 2011, suggesting the possibility of an outbreak during this period. These findings indicate that NoV is circulating in the community children as an agent of gastroenteritis, should now be considered in the differential diagnosis and in the institution of measures to control transmission.

Key-words: Gastroenteritis, Norovirus, Diarrhea.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Organização Genômica do NoV.....	14
Figura 2 - Estrutura do Norovírus.....	15
Quadro 1 - Resumo das funções das proteínas do genoma do Norovírus.....	16
Figura 3 - Genoma do NoV com as regiões para detecção e genotipagem.....	17
Quadro 2 - Classificação em genogrupos e genótipos do Norovírus.....	17
Figura 4 - Exemplo de árvore filogenética do gênero Norovírus.....	18
Figura 5 - Características dos surtos de Norovírus.....	20
Figura 6 - Distribuição dos genótipos de NoV encontrados no Brasil.....	25
Figura 7 - Casos de diarreia por agentes virais no Paraná, por faixa etária entre Jan/12 e Jan/13.....	26
Quadro 3 - Reagentes utilizados na reação de Transcrição Reversa (RT).....	30
Quadro 4 - Reagentes utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	31
Figura 8 - Resultado da Amplificação pela PCR em gel de agarose a 1,2% das cepas controle de NoV.....	33
Figura 9 - Amplificação pela PCR das cepas controle diluídas de NoV.....	34
Figura 10 - Amplificação das cepas controle de NoV e da cepa controle de Influenza e Rotavírus.....	34
Figura 11 - Amplificação de cepas controles de NoV diluídas usadas na curva de Cloreto de Magnésio.....	35
Figura 12 - Diferentes concentrações da enzima <i>Taq</i> Polimerase na amplificação de cepas controles de NoV.....	35
Figura 13 - Distribuição das idades conforme o resultado do NoV na RT-PCR.....	36
Tabela 1 - Distribuição das amostras positivas e negativas segundo idade e gênero.....	36
Figura 14 - Produtos da amplificação pela PCR (344 pb) das amostras em estudo coletadas no município de Guarapuava.....	36
Figura 15 - Distribuição mensal das amostras incluídas no estudo, conforme resultado da detecção para NoV.....	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AIH	Autorização de Internamento Hospitalar
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
dCTP	Desoxinucleotídeo de Citosina trifosfato
dGTP	Desoxinucleotídeo de Guanina Trifosfato
DNA	Ácido desoxirriboncléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxinucleotídeos Trifosfato
dTTP	Desoxinucleotídeo de Timina Trifosfato
EIE	Enzima Imuno Ensaio
GA	Gastroenterite Aguda
HBGAs	Histo Blood Group Antigens
IEM	Imuno Microscopia Eletrônica
Kb	Kilobase
KDa	Kilo Daltons
MDDA	Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas
ME	Microscopia Eletrônica
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
NoV	Norovírus
NTPase	Nucleosídeo trifosfatase
ORF	Open Reading Frame
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por minutos
RT	Transcrição Reversa
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	10
1.1 Gastroenterite.....	10
1.2 Patógenos virais de maior importância clínica.....	11
1.3 Breve histórico do Norovírus	12
1.4 Estrutura e classificação	13
1.5 Patogênese e transmissão	19
1.6 Imunidade.....	21
1.7 Diagnóstico laboratorial	22
1.8 Epidemiologia	23
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 METODOLOGIA	28
3.1 Inclusão de pacientes.....	28
3.2 Amostras clínicas	28
3.3 Cepas controle.....	28
3.4 Suspensão fecal a 10% para extração de RNA	29
3.5 Extração do RNA viral.....	29
3.6 Reação da transcrição reversa (RT).....	29
3.7 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	30
3.8 Análise dos amplicons por eletroforese em gel de agarose:.....	31
3.9 Otimização e padronização da RT-PCR.....	31
3.9.1 Limite de Detecção.....	32
3.9.2 Variações na temperatura de anelamento	32
3.9.3 Especificidade Analítica dos primers	32
3.9.4 Variações na concentração do Cloreto de Magnésio.....	32
3.9.5 Variações na concentração da enzima <i>Taq</i> DNA polimerase	32
4.1 Padronização da RT-PCR.....	33
4.1.1 Limite de detecção	33
4.1.2 Especificidade Analítica dos primers	34
4.1.3 Variações nas Concentrações do Cloreto de Magnésio.....	35
4.1.4 Curva de enzima <i>Taq</i> Polimerase.....	35

4.1.5 Temperatura de Anelamento	36
4.2 Detecção de Norovírus nas amostras incluídas no estudo.....	36
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÃO	42
ANEXOS.....	59

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Gastroenterite

O Ministério da Saúde (2009) definiu a gastroenterite aguda (GA) como uma doença caracterizada pelo aumento no número de evacuações, com fezes líquidas ou de pouca consistência, podendo ser acompanhada de náuseas, vômito, febre, dor abdominal e em algumas situações com muco e sangue presentes nas fezes. Quando o quadro de diarreia torna-se grave, com a perda de líquidos e eletrólitos, pode levar à desidratação e complicações que, principalmente em lactentes e crianças, podem levar ao óbito (PARASHAR et al., 2003). Estudos recentes da literatura apontam para uma redução na mortalidade da diarreia, contudo esta doença continua a ser a segunda maior causa mundial de morte em crianças menores de 5 anos de idade em países de baixa e média renda (WALKER et al., 2012).

A GA representa um problema social, econômico e de saúde pública de grande importância, tanto nos países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos (WHO, 2009). Presume-se que a diarreia tenha sido responsável por 9,9% dos 7,6 milhões de mortes em 2010, representando mais de 751.000 mortes por ano mundialmente (LIU et al., 2012). A GA se mostra de forma mais grave em crianças desnutridas e expostas a uma condição de saneamento básico precário, aliado a um sistema de saúde ineficiente ou inexistente. Sendo assim, pode-se dizer que esta doença é um indicador de saúde, expressando as desigualdades sociais (BRYCE et al., 2005; WHR, 2005; BARRETO et al., 2007). Estima-se que o número de casos divulgados sejam bem superior, visto que não é uma notificação compulsória, tendo apenas notificação eventual. O tratamento caseiro, também oculta os números reais dos adoecimentos por GA (MDDA, 2002).

Esta síndrome ocupa o terceiro lugar entre as doenças que mais causam morbidade em crianças em países em desenvolvimento e é responsável por um terço de todas as hospitalizações de crianças menores de cinco anos (PEREIRA & CABRAL, 2008). Ela ocupa a segunda posição no quadro de notificação em países desenvolvidos, seguido apenas da infecção respiratória (PARASHAR et al., 2006). Segundo dados da MDDA (Monitoramento das Doenças Diarreicas Agudas, 2008), no Brasil há registros no sistema AIH/DATASUS (Autorização de Internamento Hospitalar) de que 600 mil internações ocorrem por ano devido à doença infecciosa intestinal, causando 8 mil

mortes. Isto representa uma perda econômica significativa para o país e importante prejuízo de saúde da população. Durante o ano de 2012, no Brasil, a MDDA registrou 874.768 casos de diarreia, sendo 75.463 em menores de 1 ano, 196.662 casos entre 1 a 4 anos, 98.283 entre 5 a 9 anos, 495.564 em maiores de 10 anos e 8.796 foram ignorados.

As doenças diarreicas podem ser provocadas por diferentes agentes etiológicos, incluindo bactérias, parasitos e vírus (GLASS et al., 2001). Nas décadas de 40 e 50, os vírus já eram considerados patógenos responsáveis por causar diarreia aguda, mas o envolvimento destes agentes com a infecção era feita somente por exclusão (JORDAN & GORDON, 1953). Os vírus são agentes de grande importância nesta infecção principalmente em crianças. Clinicamente é muito difícil distinguir a GA provocada por vírus, daquela provocada por bactéria. As viroses geralmente são autolimitadas, com duração dos sintomas de aproximadamente 1 a 7 dias (WILHELMI et al., 2003).

1.2 Patógenos virais de maior importância clínica

Rotavírus é o agente etiológico viral de maior importância a causar diarreias em crianças, resultando em 2,4 milhões de hospitalizações e 25 milhões de consultas médicas (ESTES et al., 2007) e aproximadamente 611.000 mortes por ano (PARASHAR et al., 2006). Nas últimas décadas este vírus recebeu grande atenção pelo número de infecções causadas o que culminou no desenvolvimento de duas novas vacinas contra este vírus: RotaTeq[®] (Merck Sharp Dohme, EUA) e Rotarix[®] (GlaxoSmithKline, Bélgica) (HYSER & ESTES, 2009). Em 2006, a vacina Rotarix[®], composta da cepa viral atenuada G1P[8], foi incluída no programa nacional de imunização, prevenindo a gastroenterite grave e reduzindo significativamente a frequência de detecção deste vírus (GURGEL, CORREIA & CUEVAS, 2008).

Norovírus (NoV) é o segundo agente etiológico mais importante a causar gastroenterite grave em crianças menores de 5 anos de idade (PATEL et al., 2008). Considerando o sucesso da vacinação contra o Rotavírus, as noroviroses têm se destacado em alguns estudos como importante causa de diarreia na Europa, Ásia e América (JUNQUERA et al., 2009). Alguns estudos já apontam para o NoV como o patógeno principal nas epidemias de gastroenterites virais em todos os grupos etários (KITIGUL et al., 2009), sendo responsáveis por mais de 1,1 milhões de hospitalizações e 218.000 mortes infantis/ano em países em desenvolvimento (VICTÓRIA et al., 2007). Já nos Estados Unidos, o NoV vem sendo responsável por

19-21 milhões episódios de doença que resultou em 56.000-76.000 hospitalizações e 570-800 mortes a cada ano (HALL et al., 2013). HALL et al (2011) mostrou em um estudo feito nos Estados Unidos que NoV foi responsável por provocar gastroenterites de 4 e 15 vezes mais que bactérias e parasitos respectivamente. Devido a estes grandes números de infecções provocadas por este vírus neste país, já existem estudos para o desenvolvimento de uma vacina. BARTSCH e colaboradores (2012), fizeram uma simulação de um modelo de vacina para o NoV, determinando o seu potencial econômico, eficácia e benefício e os resultados mostraram que há uma relação custo – benefício satisfatória.

Outros agentes virais representam possibilidades etiológicas nas GA, como o Adenovírus entérico que tem uma incidência de 1-8% em países industrializados e de 2-31% em países em desenvolvimento (MAGWALIVHA et al., 2010). Astrovírus ocorre principalmente em crianças jovens e idosos e a incidência em crianças com diarreia esporádica é entre 2,5 e 10% (MATSUI & GREENBERG, 2001).

Grande parte dos trabalhos publicados no Brasil sobre gastroenterite viral em crianças é feito em ambientes fechados, como hospitais, asilos e creches (VICTORIA et al., 2007; CILLI et al., 2011; FERREIRA et al., 2012), o que gera dúvidas sobre o comportamento destes patógenos virais em comunidades. Descobrir estas informações é importante para se estabelecer estratégias de prevenção e controle destas infecções na população (BARRETO et al., 2006).

1.3 Breve histórico do Norovírus

Os NoV foram descritos na década de 30, quando foi usado por Zagorski (1929) a expressão de “winter vomiting disease”. Ele descreveu como sendo uma doença altamente infecciosa, cujos sintomas principais eram: vômitos, dores abdominais e diarreia. Mais tarde, outros surtos com as mesmas características foram descritos por outros pesquisadores (REIMANN et al., 1945a,b; CLARCK et al., 1972).

Em 1972 houve um surto de diarreia em Norwalk, Ohio, Estados Unidos da América (EUA), sendo que 50% dos estudantes e professores de uma escola primária desenvolveram gastroenterite com duração dos sintomas de dois dias e período de incubação de 24 h. As principais manifestações clínicas foram náuseas, vômitos e diarreia (DOLIN et al., 1971). Pela impossibilidade de cultivo celular deste patógeno, foram realizados estudos de imunomicroscopia eletrônica (IME) com filtrado de fezes

de voluntários e soro de não voluntários convalescentes, quando observou-se agregados de partículas semelhantes à vírus não envelopados de 27nm (nanômetros) de diâmetro, o qual foi chamado de vírus Norwalk. Este vírus foi reconhecido como o primeiro agente viral a causar diarreias (KAPIKIAN et al., 1972; KAPIKIAN, 2000). Primeiramente foram classificados na família picornaviridae, mais tarde foram alocados na família Caliciviridae (CDC, 2001).

A observação de uma proteína estrutural de 59Da por Greenberg et al (1981), propuseram que o Norwalk passasse a ser classificado na família Caliciviridae, baseado nas orientações propostas pelo III Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, que preconizava que os vírus pertencentes a esta família teriam como características em comuns a presença de uma proteína estrutural principal que dá origem ao capsídeo, simetria icosaédrica com 90 capsômeros, formando 32 depressões que revela a imagem de um cálice (*Calix*, em latim), por isso Caliciviridae (GREEN et al., 2000).

Ensaio imunoenzimáticos foram desenvolvidos na década de 80 para detecção de antígenos de NoV em amostras fecais e foram de grande importância na elucidação de surtos de GA (HERRMANN et al., 1985). Já na década de 90, com os avanços das técnicas de biologia molecular, foi possível caracterizar o genoma do vírus e desenvolver uma reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), para a detecção do vírus a partir de amostras fecais de humanos (JIANG et al., 1992; JIANG et al., 1993).

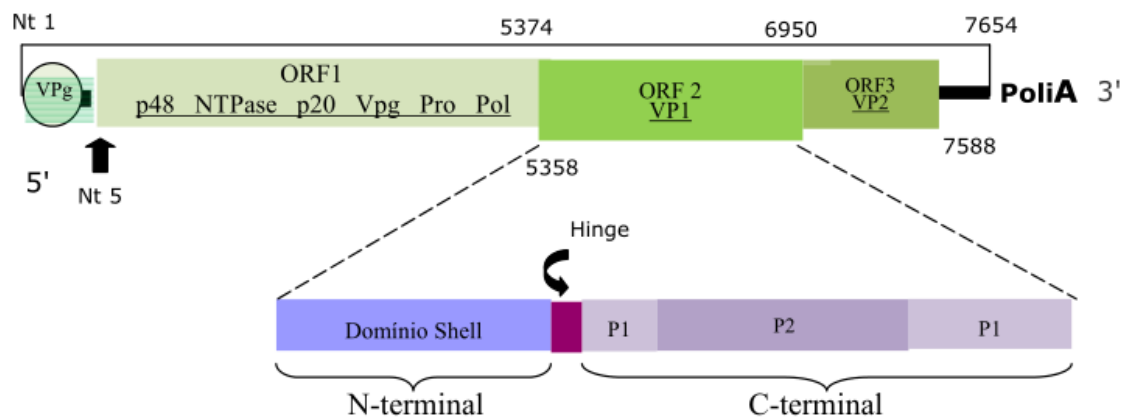
1.4 Estrutura e classificação

O NoV apresenta uma partícula com diâmetro que varia de 27 a 40nm, não envelopado e o seu genoma é constituído de RNA de fita simples, linear e polaridade positiva com aproximadamente 7,7Kb (HARDY, 2005). Sua morfologia é estudada a partir de “virus-like particles” (VLP), que se formam pela expressão de proteínas do capsídeo (VP1) em baculovírus recombinante, onde se organizam em partículas morfologicamente e antigenicamente parecidas ao NoV que são estudadas por microscopia crio-eletrônica e por cristalografia de raio X (CHEN et al., 2006).

O genoma do NoV possui na extremidade 5' uma proteína Vpg (proteína associada ao genoma) ligada covalentemente e na extremidade 3' uma cauda Poli A (poliadenilada). A organização do genoma apresenta três regiões iniciadoras de leitura (open reading frames - ORFs) conforme visualizada na figura 1. A ORF 1 codifica uma

poliproteína com aproximadamente 200kDa, que é autoclivada por uma protease de origem viral denominada proteinase cisteína (Pro). Esta clivagem dá origem a seis proteínas não-estruturais: a) p48, b) nucleosídeo trifosfatase (NTPase); c) proteína p20 ou p22 (depende do genogrupo), d) VPg; e) protease e f) RNA polimerase. As ORFs 2 e 3 codificam, respectivamente, duas proteínas estruturais: VP1, a principal proteína do capsídeo; e VP2, uma proteína estrutural básica que é responsável pelo empacotamento do genoma nos virions (HARDY, 2005).

Figura 1. Organização genômica do norovírus.

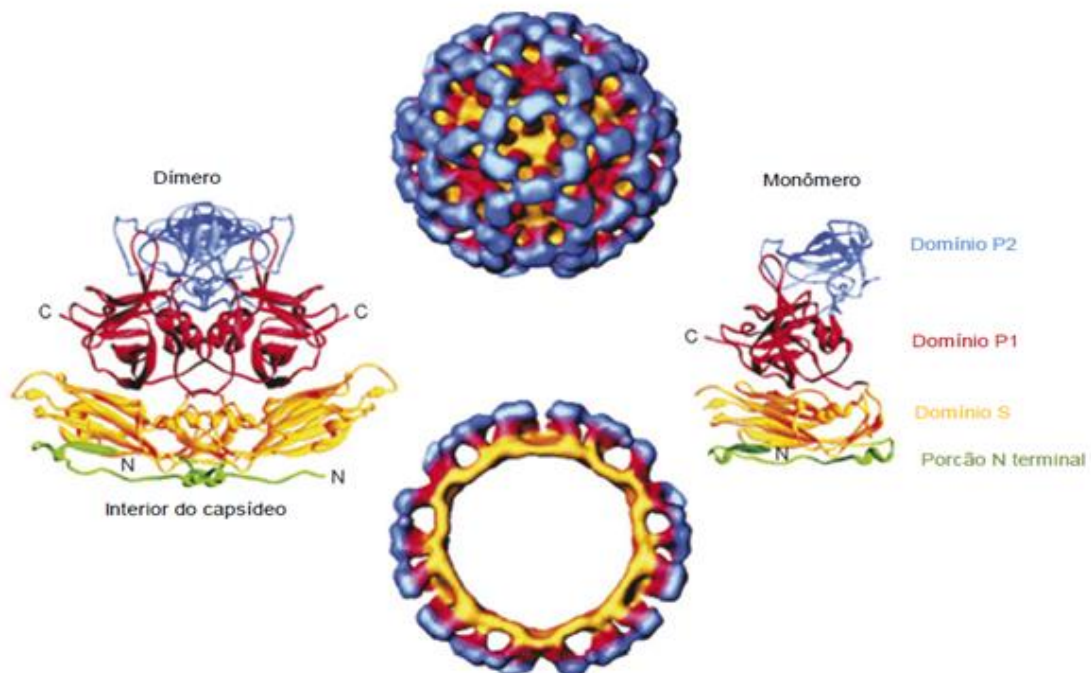


Adaptado de GREEN et al, 2007; DONALDSON et al, 2008.

A proteína VP1, conforme visto na figura 2, é composta por 180 moléculas organizadas em 90 dímeros, que formam os domínios S e P. O domínio S forma parte interna do capsídeo que envolve o genoma RNA, sendo considerada a região mais conservada do genoma viral (PRASAD et al., 1999; WILHELM I et al., 2003; HARDY, 2005). É formado por 225 aminoácidos no extremo N-terminal, com elementos essenciais para a formação do icosaedro. O domínio P é subdividido em P1 e P2 e compreende os demais aminoácidos do extremo C-terminal, este domínio interage em contatos diméricos, dando grande estabilidade ao capsídeo e formando as protusões do vírion (HARDY, 2005). O domínio P1, mais interno, está relacionado com a antigenicidade do vírion e possui sequência razoavelmente mais conservada (HALE et al., 2000; CAO et al., 2007). O domínio P2, mais externo, apresenta uma região bastante variável, de grande importância na união ao receptor celular e na imunogenicidade, é constituído por 127 aminoácidos e está inserido no domínio P1 (HARDY, 2005). Acredita-se que neste domínio estejam localizados determinantes antigênicos que

caracterizam o genótipo específico de cada cepa (VINJÉ et al., 2004; ZHENG et al., 2006). Foi caracterizado por Tan e colaboradores (2003) um provável receptor de ligação do domínio P2, que faria a ligação para diversos receptores HBGAs (Histo Blood Group Antigens). A proteína VP2 é uma proteína estrutural pequena presente no vírion (LE PENDU et al., 2006), sua função na replicação do NoV ainda não é bem entendida, mas sabe-se que ela possui grande variabilidade genética (GLASS et al., 2000; GLASS et al., 2003). Acredita-se que durante a formação do vírion esta proteína liga-se com ácido nucleico, no entanto, não há dados experimentais que comprovem (GLASS et al., 2000; GLASS et al., 2003; LE PENDU et al., 2006).

Figura 2. Estrutura do Norovírus



Adaptado de HUTSON et al., 2004.

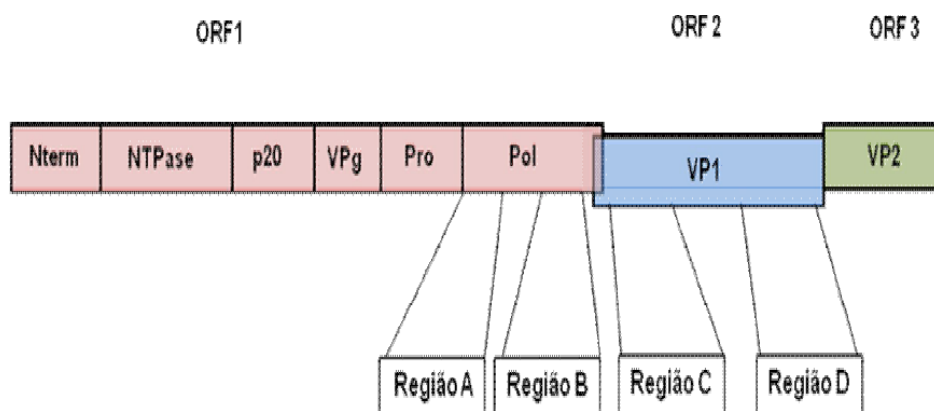
O quadro 1 sumariza algumas funções conhecidas das proteínas dos NoV, infelizmente há mais perguntas do que respostas à respeito deste assunto, mas um progresso significativo foi feito para definir algumas funções básicas das proteínas do genoma do NoV, permitindo entender melhor o processo de replicação deste vírus (HARDY, 2005).

QUADRO 1 - Resumo das funções das proteínas do genoma do Norovírus

Proteína	Função	Referência
P48	Pode ter função no transporte de proteínas no meio intracelular	ETTAYEBI & HARDY, 2003; HARDY, 2005
NTPase	Tem atividade NTPase, mas não é uma helicase	HARDY, 2005
P20/P22	Pode estar envolvido no transporte de substâncias da membrana celular e na participação na replicação viral	ETTAYEBI & HARDY, 2003; DONALDSON et al, 2008
Vpg	Pode funcionar como iniciador na replicação do RNA viral	ROHAYEM et al, 2006; BELLIOT et al, 2008
Pro	Faz segmentação da ORF 1 poliproteína, dando origem a proteínas não estruturais	SOUZA et al, 2008 CHEETHANN et al, 2006 BOK et al, 2009
Pol	Replicação do genoma viral	ROBERTS et al. 2003 SOSNOVTSEV et al, 2003
Vp1	Montagem do capsídeo, interações com o hospedeiro e imunogenicidade	ZHENG, 2006
Vp2	Esta relacionada com a expressão da proteína VP1, e a estabilidade do capsídeo	BERTOLOTTI-CIARLETE, 2003

Considerando a variabilidade genética do NoV e a relação com estudos de detecção e genotipagem, o genoma do NoV pode ser dividido em 4 regiões diferentes (A, B, C e D), conforme visualizado na Figura 3 (VINJÉ et al., 2004). As regiões A e B, consideradas mais conservadas, são importantes alvos para os ensaios de detecção e pertencem a região da RNA polimerase. Em contra partida, as regiões C e D, que apresentam grande variabilidade genética, são importantes alvos para os ensaios de genotipagem e pertencem a região do capsídeo.

Figura 3 - Genoma do NoV, com as regiões para detecção e genotipagem.



Adaptado de BARREIRA, 2008.

O gênero NoV são classificados em cinco genogrupos (GI, GII, GIII, GIV e GV) e seus respectivos genótipos, conforme a variabilidade da sequência dos nucleotídeos da região que codifica a proteína Vp1 do capsídeo (ZHENG et al., 2006). No quadro 2 esta descrito a distribuição, conforme os hospedeiros, do NoV e de genótipos para cada genogrupo.

QUADRO 2 - Classificação em genogrupos e genótipos do Norovírus.

Hospedeiro	Genogrupo	Genótipos
Humano	GI	8
Humano/Suíno	GII	17
Bovino	GIII	2
Humano	GIV	1
Murino	GV	1

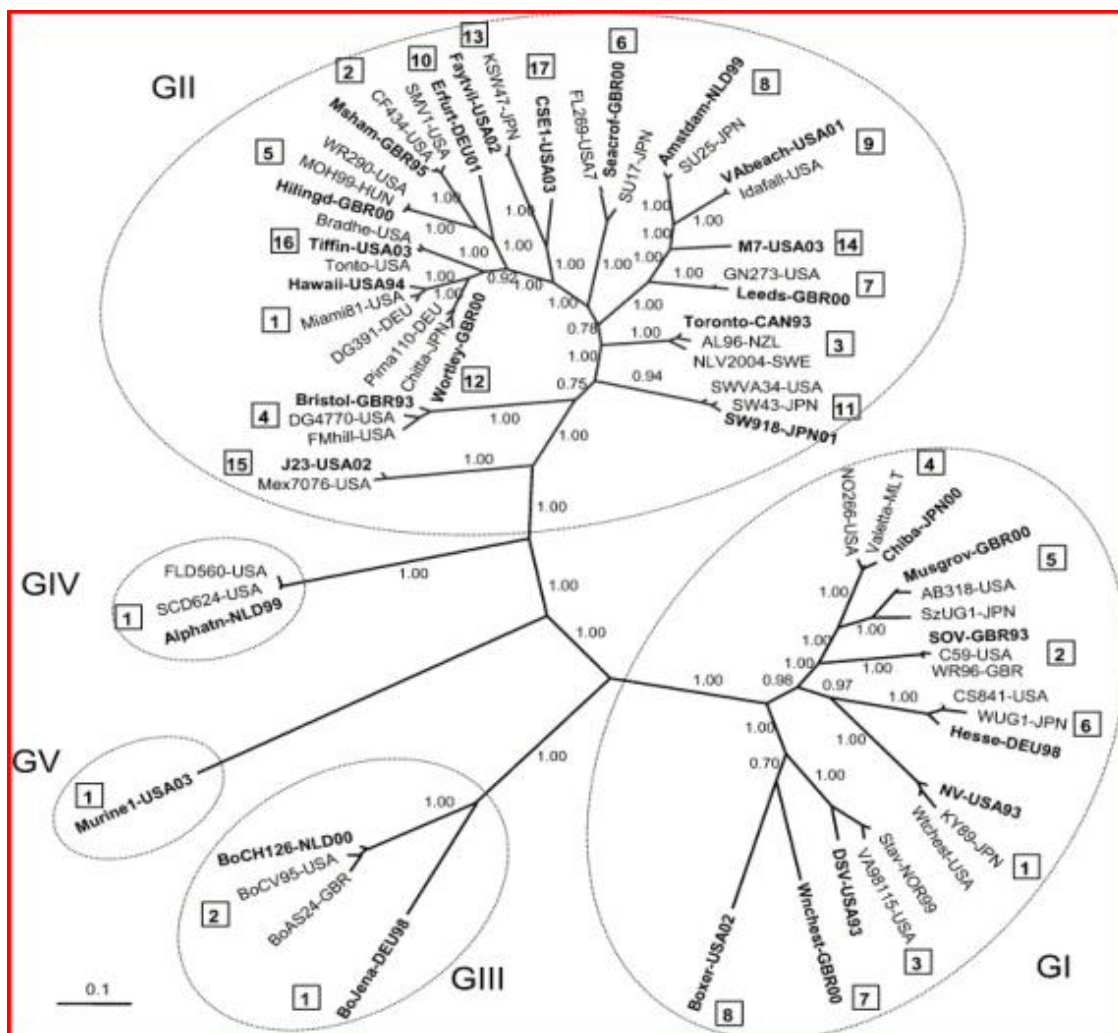
Adaptado de ZHENG et al., 2006. CDC, 2011

Mundialmente, as infecções por NoV são causadas principalmente por cepas que pertencem aos genogrupos I (GI) e II (GII), com predomínio da cepa GII (OH GAEDICKE, 2003; MORILLO, 2008), inclusive no Brasil (NAKANISHI et al., 2009). A classificação dos genogrupos do NoV é feita pela similaridade entre nucleotídeos e aminoácidos das novas cepas virais identificadas em relação ao protótipo, controle inicialmente descrito, sendo que esta proximidade classifica as cepas em um

determinado ramo da árvore filogenética, conforme exemplificado na figura 4 (ZHENG et al., 2006). A árvore mostra os cinco genogrupos relacionados com seus grupos genéticos ou genótipos, indicados nos quadrados.

Pelo método da distância sem correção, duas amostras serão consideradas pertencentes a diferentes genogrupos (G) se a distância entre elas for $\geq 45\%$ dos aminoácidos. Dentro do mesmo genogrupo, amostras que tenham distância entre $\geq 14,3\%$ e $\leq 43,8\%$ serão agrupadas em diferentes genótipos (GG) (ANDO et al., 2000; ZHENG et al., 2006).

Figura 4 – Exemplo de árvore Filogenética do Gênero Norovírus



Adaptado de ZHENG et al.; 2006.

1.5 Patogênese e transmissão

A importância de estudos voltados para a compreensão dos mecanismos moleculares de replicação do NoV e sua patogênese é inquestionável para se ter estratégias de intervenção adequadas (HARDY, 2005). A compreensão sobre estes mecanismos tem evoluído lentamente por este vírus não se multiplicarem em cultura de células e não infectar modelos experimentais de animais (DAUGHENBAUGH., 2003; ETTAYEBI., 2003). Os NoV apresentam grande variabilidade genômica e antigênica e as re-infecções de um mesmo indivíduo por diferentes genótipos são comuns de serem encontrados (DONALDSON et al., 2008).

Os vírions possuem características que os tornam altamente infecciosos, principalmente devido aos fatores que facilitam a disseminação, como a capacidade de sobreviver na passagem pelo estômago (por ter estabilidade em pH ácido), o alto nível de excreção viral (10^8 a 10^{10} cópias de RNA/g de fezes), dose infectante baixa, (menos de 20 partículas virais) (LEE et al., 2007; TU et al., 2008), a alta resistência à desinfecção (resiste a cloração até 10ppm) e estabilidade ambiental (sobrevive ao congelamento e aquecimento até 60°C) (CDC, 2001).

Estudos mostram que a eliminação do vírus pode continuar por mais de 3 semanas após a fase sintomática da doença, além da possibilidade de infecções assintomáticas (OKHUYSEN et al., 1995; ROCKX et al., 2002). O curso da doença é rápida em adultos imunocompetentes, com duração de 24-48 horas e o término dos sintomas ocorre entre 12-72 horas (ESTES, PRASAD & ATMAR, 2006). Em grupos de risco, como pacientes transplantados e imunossuprimidos, os sintomas podem durar mais que 7 meses, com infecção crônica grave (WESTHOFF et al., 2009), e em crianças jovens, lactentes e idosos podem se agravar durando até 6 semanas. Os sintomas incluem vômitos, diarreia, com ou sem náuseas, cólicas abdominais, febre e mal estar (KIRKWOOD, 2008; ZINTZ et al., 2005). Acredita-se que as variações na duração dos sintomas deva-se à variabilidade das diferentes cepas do vírus, dado a circulação de vários genótipos na comunidade (ROCKX et al., 2002).

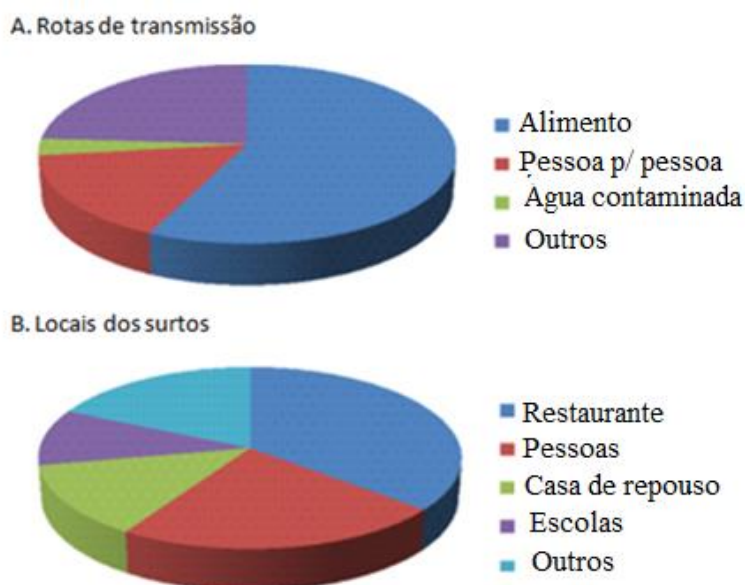
Na década de 70, foram feitos os primeiros estudos de infecção experimental com voluntários saudáveis, na tentativa de elucidar o sítio de replicação do NoV e as primeiras descrições histopatológicas foram feitas, observando o intestino delgado daqueles indivíduos que desenvolveram a gastroenterite. Traeger e colaboradores (2009)

observaram em biópsias feitas do jejuno, lesões histopatológicas como: desorganização das células epiteliais, achatamento das vilosidades, vacuolização do citoplasma, infiltração da lâmina própria por células mononucleares, aumento no número de corpos lisossomais e dilatação do retículo endoplasmático.

A transmissão do NoV é fecal-oral, a disseminação ocorre pelos alimentos e água contaminadas ou diretamente de pessoa para pessoa, principalmente em lugares de grande aglomeração de pessoas, como creches, escolas, hospitais, navios e águas de recreação (MAUNULA et al., 2004; GOODGAME, 2007; KRONEMAN et al., 2008). Os alimentos podem ser contaminados por pessoas infectadas que o manipulam, quando o alimento é lavado com água contaminada ou por via externa, como por exemplo moluscos. Sabe-se que há um grande consumo de ostras e moluscos crus que podem servir como fonte da infecção por NoV (RONVEAUX et al., 2000; BERG et al., 2000). Além das fezes, aerossóis formados pelos vômitos podem contaminar superfícies ou alcançarem a mucosa oral de pessoas próximas ao doente, isto pode explicar a rápida disseminação da doença em hospitais e intra domicílios (CDC, 2010).

O Centro de Controle de Doenças (CDC), nos EUA, avaliando 232 amostras, entre julho de 1997 e junho de 2000, observou que o alimento foi a principal rota de transmissão em casos de surtos de NoV (figura 5A). Ainda, o estudo destacou os restaurantes como o local onde mais aconteceram surtos (figura 5B) (KARST., 2010).

Figura 5 - Características dos surtos de Norovírus



Adaptado de KARST., 2010.

A compreensão dos mecanismos da transmissão deste patógeno é importante para o entendimento das formas de prevenção da infecção por estes agentes. A simples lavagem das mãos e a desinfecção de material contaminado podem diminuir a transmissão entre os membros da família do doente ou em instituições. Outro fator eficaz na prevenção deste patógeno é o tratamento da água potável, já que o NoV pode ser transmitido através da água (LOPMAN et al.; 2004).

1.6 Imunidade

Ainda não é bem conhecido o mecanismo de imunidade do hospedeiro infectado pelo NoV (DONALDSON et al., 2010), nem se esta imunidade é duradoura, mesmo que seja para um mesmo genótipo de uma re-infecção (LINDESMITH., 2010). Há relatos que existem pessoas naturalmente resistentes à infecção viral, ou mesmo que se infectem podem resultar em infecções assintomáticas. Entre as possíveis explicações estão o desenvolvimento de imunidade específica pela exposição ao NoV, resistência genética ou resposta imune do tipo inata (DONALDSON et al., 2010).

Existem estudos que mostram diferentes susceptibilidades de pessoas em relação a infecção do NoV humano, como por exemplo a influência do fenótipo de antígenos de grupos sanguíneos (histo-blood group antigens – HBGAs) (HUTSON et al., 2004; CHEETHAM et al., 2006). Os HBGAs fazem parte de um complexo de carboidratos que se ligam a glicoproteínas ou glicolipídeos presentes nos glóbulos vermelhos, células epiteliais de mucosas, fluídos corporais como no sangue, saliva, conteúdo intestinal e leite materno (TAN & JIANG, 2005). A interação entre NoV e HBGAs tem sido extensivamente estudada, desde sua descrição inicial em 2002 (HUTSON et al., 2002; MARIONNEAU et al., 2002; HARRINGTON et al., 2002). Estudos recentes mostram correlação do grupo sanguíneo do hospedeiro, sugerindo ser parte do receptor viral (RYDELL et al., 2011). Indivíduos que possuem a capacidade de expressar os antígenos dos grupos sanguíneos na superfície das mucosas é que seriam susceptíveis à infecção por NoV, chamados de secretores positivos (TAN & JIANG, 2005; FRENCK et al., 2012). Mutações no gene FUT 2 que codifica $\alpha(1,2)$ fucosiltransferase são responsáveis pelo fenótipo não secretor, levando a falta de expressão de HBGs na superfície das células intestinais, tornando-se indivíduos menos suscetíveis a infecção. Contudo, os chamados secretores não explicam as diferenças observadas entre as pessoas infectadas e não infectadas para todas as cepas de norovírus, outros fatores de imunidade

provavelmente estão envolvidos, e este continua a ser um campo a ser explorado na pesquisa (LINDESMITH et al., 2008). Trang e colaboradores (2014) fizeram um estudo epidemiológico em uma população de crianças, demonstrando que o fenótipo HBGs é um fator de suscetibilidade à infecção de NoV, todos os casos positivos eram secretores ou parcialmente secretores.

A grande variabilidade genética dos diferentes genótipos do NoV, que resulta numa dificuldade em estabelecer uma resposta imunológica protetora, é a maior responsável pelo grande número de surtos causados por este vírus no mundo todo e também pelo insucesso na tentativa de criação de uma vacina eficiente (MMWR, 2011; LINDESMITH, 2011).

1.7 Diagnóstico laboratorial

A microscopia eletrônica (ME) é considerada uma técnica importante, mas com baixa sensibilidade, pois requer uma concentração viral de pelo menos 10^6 partículas/mL na amostra e podem ser confundidos com outros vírus pequenos e arredondados, como os picornavírus, enterovírus e astrovírus (ATMAR & ESTES, 2001; WANG, COSTANTINI & SAIF, 2007). A IEM é uma variante da ME e também pode ser empregada para identificação do NoV. Esta técnica confere uma sensibilidade 10 vezes maior que a ME, porém sua especificidade pode variar dependendo do reconhecimento do anticorpo empregado. Existem dois fatores também que limitam a execução desta técnica: a utilização de equipamentos de alto custo que exigem expertise de recursos humanos e o tempo que leva para avaliar uma única amostra (WANG et al., 2007).

O ensaio imunoenzimático (EIE) foi desenvolvido a partir da expressão das proteínas VP1 e VP2 (VLP) em diferentes sistemas para detecção de antígenos e de anticorpos (LOCHRIDGE & HARDY, 2003). A sensibilidade deste teste pode ser comparável à IEM e se destaca por não ter reação cruzada com outros vírus gastroentéricos (ATMAR & ESTES, 2001). A grande diversidade genética do NoV provoca uma limitação deste ensaio (GUNSON et al., 2003).

Outro ensaio laboratorial que utiliza o princípio do reconhecimento viral pelo reconhecimento entre antígeno e anticorpo, o imunocromatográfico contém no interior da fita-teste anticorpos anti-norovírus (GII3 e GII4). Embora não seja capaz de detectar todos os genótipos GII em amostras fecais, é um teste de grande importância na

prevenção da disseminação do vírus em casos de surtos, pois é de fácil execução, rápido e barato (BULL et al., 2006; THONGPRACHUM et al., 2010).

Embora NoV tenha sido o primeiro vírus associado a GA, a falta de métodos para cultivá-lo subestimou a importância deste vírus, tanto em casos esporádicos como em surtos, que só puderam ser melhor detectados após o desenvolvimento de métodos moleculares (MORILLO et al., 2008; MORILLO et al., 2011). A importância do NoV passou a ser relevante com a RT-PCR, esta técnica molecular é amplamente usada em todo o mundo, podendo detectar o genoma do NoV em amostras contendo 10^2 - 10^4 partículas virais, mostrando alta sensibilidade e especificidade (GLASS et al., 2000; RABENAU et al., 2003).

1.8 Epidemiologia

Recentemente, estudos vêm sendo publicados demonstrando a importância das noroviroses nas gastroenterites em humanos de todas as idades e em todo o mundo (LESHEM et al., 2013; FERREIRA et al., 2012; CILLI et al., 2011; BUCARDO et al., 2011; TUAN et al., 2012). Sua distribuição varia bastante, ocorrendo com picos de sazonalidade de acordo com o continente e regiões estudadas, casos esporádicos e surtos que podem ocorrer em todos os meses do ano (MOUNTS et al., 2000).

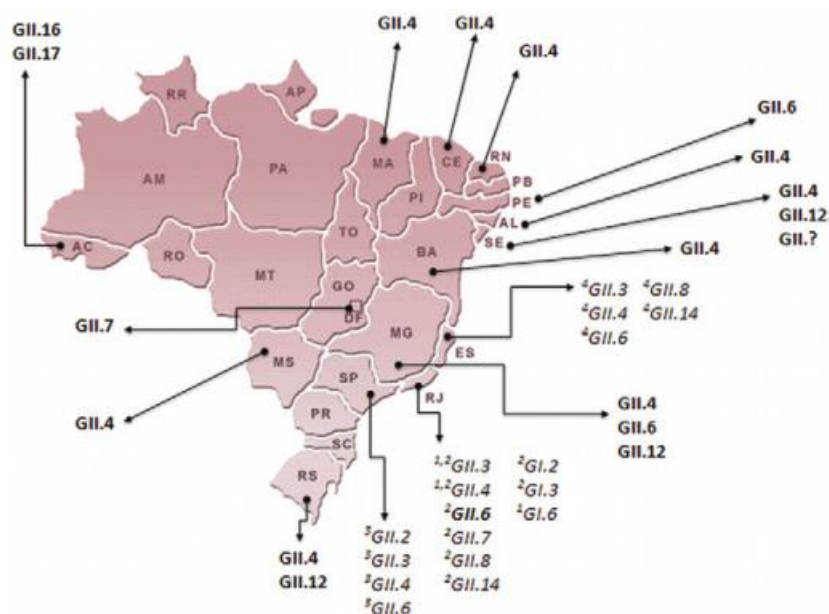
No Brasil, foi feito um estudo em Recife por Nakagomi e colaboradores (2008) com o objetivo de verificar a gravidade das diarreias provocadas por NoV e Rotavírus em crianças hospitalizadas. O resultado mostrou que a infecção por NoV durante a infância pode ser tão grave quanto a infecção por Rotavírus, com uma diarreia intensa que pode levar à desidratação. Os NoV foram detectados em 15% (34/233) das amostras e a prevalência foi em crianças menores de 5 anos, sem um padrão de sazonalidade, pois ocorreram o ano todo. Já em São Paulo, Cilli e colaboradores (2011) realizaram um estudo com amostras de fezes obtidas por conveniência (sem critérios de inclusão ou exclusão) de crianças de até 5 anos de idade atendidas em centros médicos por um período de 6 anos. O resultado mostrou similaridade entre Rotavírus e NoV em crianças que necessitaram ser hospitalizadas, detectando-se os vírus em 29,6% (144/487) e 29,2% (26/89), respectivamente. Aragão (2013) realizou o primeiro estudo na região da Amazônia, Norte do Brasil, em uma comunidade isolada (Quilombola), descendentes de escravos, com objetivo de detectar vírus entéricos em crianças menores de 10 anos com

diarreia. O resultado mostrou detecção para NoV com 19,7% em crianças entre 1- 5 anos e os meses de ocorrência foram janeiro, fevereiro e agosto. Em amostras ambientais como: água do mar, água potável, água superficial (riacho e lagoa) e esgoto tratado Victoria e colaboradores (2010) detectaram. NoV em 22 amostras (23%) coletadas na cidade de Florianópolis do estado de Santa Catarina. Estudos de soroprevalência, em diferentes locais do mundo, confirmam que a aquisição da primeira infecção por NoV ocorre realmente em crianças jovens, pois ao menos 50% das crianças menores de 5 anos de idade já apresentavam anticorpos contra o NoV (NURMINEM et al., 2011).

Durante o ano de 2012, foi relatada à emergência de uma nova cepa de NoV, a GII4 Sydney, que causou grande preocupação sobre seu potencial de circulação nos EUA. Foram analisados os surtos de cinco estados na temporada de 2012 e 2013 e, comparado aos dados do ano anterior, a proporção de surtos de GII4 chegou a aumentar de 8% para 82% (LESHEM et al., 2013).

No Brasil o sistema de vigilância de diarreia aguda não inclui o diagnóstico de NoV, o que prejudica a capacidade de avaliar o seu real impacto. Os dados são quase sempre obtidos por instituições de pesquisa em ambientes fechados, o que denota para a necessidade de se estudar este vírus em comunidades. Um estudo da circulação dos genótipos de NoV em vários estados do Brasil mostrou predomínio do genótipo GII4 (FIORETTI et al, 2011), conforme mostrado na figura 6.

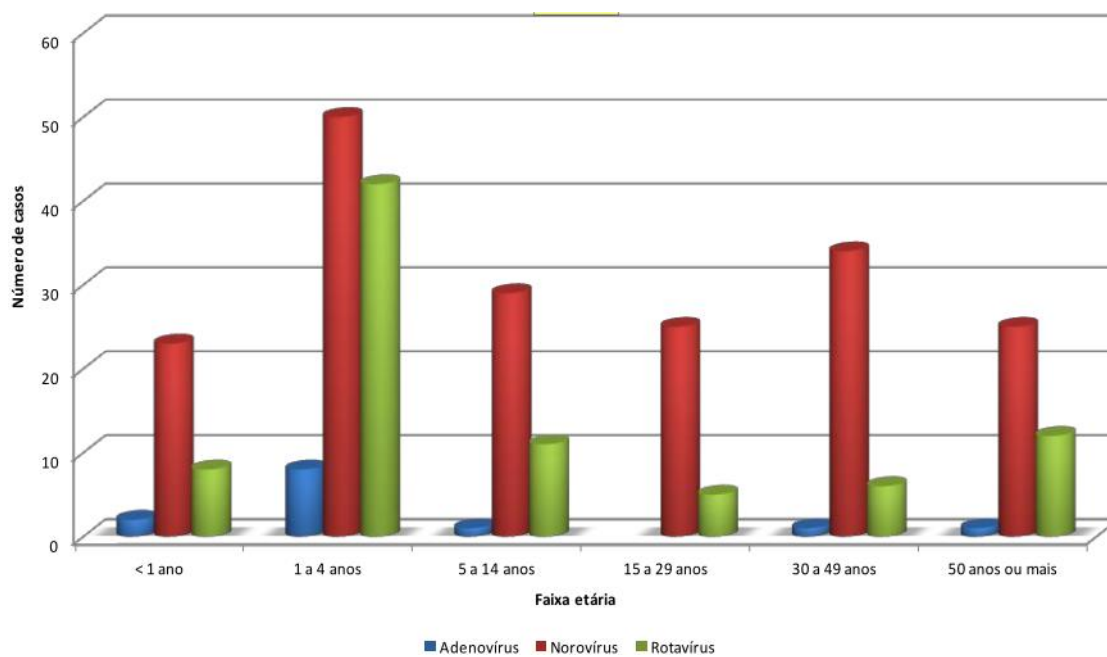
Figura 6. Distribuição dos genótipos de NoV encontrados no Brasil



Adaptado: FIORETTI et al., 2011.

Na mesma figura, pode-se observar a ausência estudos deste tipo em alguns estados, como no Paraná. Os dados disponíveis no estado são poucos e a maioria resulta da notificação realizada pelo Centro de Informações e Respostas Estratégicas de Vigilância em Saúde. No período de 01/2012 e 01/2013 a MDDA, através de informações do LACEN-PR/CIEVS, mostrou a frequência de casos de diarreia por agentes virais identificados no Paraná segundo a faixa etária (figura 7), onde podemos observar a detecção de NoV em todas as idades, com maior concentração de casos em crianças de 1-4 anos (CIEVS, 2013).

Figura 7. Casos de diarreia por agentes virais no Paraná, por faixa etária entre Jan/12 e Jan/2013.



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a ocorrência de infecções por Norovírus genogrupo GII em crianças com gastroenterite de até 5 anos de idade atendidas no sistema de saúde municipal de Guarapuava-PR.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar e otimizar uma técnica para diagnóstico de Norovírus genogrupo GII por RT-PCR em amostras de fezes.
- Detectar a ocorrência do Norovírus genogrupo GII em crianças com gastroenterites com até cinco anos de idade no município de Guarapuava-PR.

3 METODOLOGIA

3.1 Inclusão de pacientes

Foram incluídas no estudo 120 crianças de até cinco anos de idade que, após atendimento pediátrico em qualquer serviço da rede de saúde do município de Guarapuava-PR, solicitaram a investigação de gastroenterite para pesquisa de antígenos de Rotavírus, parasitológico ou cultura bacteriológica de fezes. A inclusão dos casos ocorreu no laboratório clínico municipal responsável pela realização deste exame, e a coleta das amostras ocorreu entre março de 2011 a fevereiro de 2012. No momento da recepção da amostra clínica para a detecção do agente etiológico no laboratório, um membro da equipe abordou e explicou o projeto para os pais ou responsáveis pela criança e após sua concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1), houve a separação de uma alíquota da amostra que foram transportadas sob refrigeração até o laboratório de Virologia e Biologia Molecular da UNICENTRO. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Unicentro número 156852/2011 (Anexo 2).

3.2 Amostras clínicas

As amostras de fezes frescas recebidas pelo laboratório em frasco coletor estéril e devidamente identificados foram separadas em alíquotas em suspensão final de 10% em solução salina tamponada em fosfato (PBS, pH 7,2) e armazenados sob congelamento a -70°C.

3.3 Cepas controle

Amostras de cepas controles de NoV GII foram gentilmente cedidas pelo Dr. José Paulo Gagliardi Leite do Laboratório de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro.

3.4 Suspensão fecal a 10% para extração de RNA

Adicionou-se 1g de amostra fecal em 1mL de solução salina tamponada em fosfato (PBS, pH 7,2) e, após homogenização em vórtex, foi estocado a -70°C até o momento da análise.

3.5 Extração do RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada pelo Kit comercial “QIAamp Viral RNA[®] (Qiagen GmbH., Alemanha), a partir da suspensão fecal de 10%, que foram descongeladas e submetidas a clarificação por centrifugação em Microcentrífuga SL-2000 (Spinlab, Brasil) a 3500 rpm por 30 minutos. Após a centrifugação, foram utilizados 200µL do sobrenadante clarificado e a extração foi realizada conforme as instruções do fabricante do kit. O RNA viral extraído foi utilizado na reação de RT-PCR.

3.6 Reação da transcrição reversa (RT)

A síntese de cDNA (ácido dextrorribonucléico complementar) foi obtida a partir do 10µL RNA extraído das amostras fecais, acrescido de 1µL de iniciador randômico a 200ng/µL (Random Primer, Invitrogen, EUA) foram adicionados ao tubo de reação de PCR de 200µL de parede fina e aquecidos a 80°C por 10 minutos com posterior resfriamento a 4°C por 5 minutos. Logo após, foi adicionada a mistura de reagentes para a transcrição (quadro 3), constituída por água de grau molecular (obtida de filtro MiliQ–Millipore, EUA), MgCl₂ (Invitrogen, EUA), tampão para esta reação concentrado 5 vezes (250mM Tris-HCl, pH8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂) desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) dATP, dTTP, dCTP, dGTP, enzima transcriptase reversa “Moloney Murine Leukemia Virus” (MMLV-RT) - (Invitrogen, EUA) e inibidor de RNase (Invitrogen, EUA) para um volume final de 25µL. Após, a síntese do cDNA foi realizada em termociclador Multigene TC 9600G (Labnet Laboratory, EUA) a 42°C durante 60 minutos.

Quadro 3 - Reagentes utilizados na Reação de Transcrição Reversa (RT)

Reagente	Concentração	Volume
H ₂ O grau molecular	-	5,5µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂	1×	5µL
MgCl ₂	4mM	2µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	0,8mM	1µL
RNAase	20U/µL	0,5µL
Transcriptase Reversa MMLV	200U/µL	1µL

3.7 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Para a detecção do NoV GII foi amplificado um fragmento do genoma viral na região N-Terminal, que faz parte do domínio SHELL da proteína VP1 do capsídeo, específico para NoV GII e amplifica 344 pb (KOJIMA et al., 2002), utilizando os iniciadores: G2SKF 5'-CNT GGG AGG GCG ATC GCA A-3' (nt 5058-5076) e G2SKR 5'-CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT-3' (nt 5401-5423).

Foram utilizados para a reação de amplificação 10µL do cDNA e 15 µL da mistura de reagentes do (Quadro 4). Água de grau molecular (obtida de filtro MiliQ–Millipore, EUA), MgCl₂ (Invitrogen, EUA), tampão para esta reação concentrado 10 vezes (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), oligonucleotídeos G2SKF (senso) e G2SKR(anti-senso), enzima Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen, EUA), com volume final da reação de 25µL. Após, a amplificação foi realizada em termociclador (Multigene TC 9600G, Labnet Laboratory, EUA), as amostras foram submetidas uma etapa de desnaturação de 94°C por 3 minutos, foram realizados 35 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, seguido de uma etapa de alongação de 72°C por 7 minutos. O produto desta amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,2%.

Quadro 4 -Reagentes utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Reagente	Concentração	Volume
H ₂ O grau molecular	-	8,25µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂	1×	2,5µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	0,4mM	2,0µL
MgCl ₂	3mM	1,5µL
Mistura G2SKF e G2SKR	0,2µM	0,5µl
TaqDNA polimerase	1,25U/L	0,75µL
cDNA	-	10µL

3.8 Análise dos amplicons por eletroforese em gel de agarose:

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão Tris/borato/EDTA - TBE (Tris 0,089M; ácido bórico 0,0089M; EDTA 0,002M pH 8,0), contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen, EUA). A corrida foi realizada em cuba de eletroforese horizontal, utilizando como tampão de corrida TBE 0,5X (Tris 1M; ácido bórico 0,9M; EDTA 0,00M pH 8,4) a uma voltagem de 140 volts por 60 minutos. Um volume de 7,5µl do produto amplificado foi misturado com 2,5µl da solução de corante azul de bromofenol (0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30%) e aplicado a cada canaleta correspondente. O resultado de cada amostra foi avaliado em comparação ao padrão de peso molecular de 100pb DNA Ladder (Invitrogen, EUA). A análise do gel foi realizada através da visualização sistema de foto documentação sob luz ultravioleta Alphamager HP (Protein Simple, EUA).

3.9 Otimização e padronização da RT-PCR

A PCR foi otimizada utilizando cepas controles de NoV GII e controle negativo (água de grau molecular) e algumas variações nos componentes da reação foram feitas com diluições variadas das cepas controles, visando melhorar o rendimento da reação com base na intensidade do brilho das bandas após a amplificação, sem o aparecimento de bandas inespecíficas.

3.9.1 Limite de Detecção

Este parâmetro foi realizado com as seguintes diluições das cepas controles da extração: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Esta observação foi feita pela intensidade do brilho das bandas de 344 pb, sem o aparecimento de bandas inespecíficas.

3.9.2 Variações na temperatura de anelamento

Foram variadas temperaturas de anelamento dos primers na PCR entre 51°C e 61°C. O melhor rendimento na reação foi considerado pela observação da intensidade do brilho da banda específica em gel de agarose após eletroforese.

3.9.3 Especificidade Analítica dos primers

Os iniciadores G2SKR/G2SKF foram testados com cepas controles do rotavírus, vírus influenza, vírus Sincicial Respiratório e Adenovírus cedidas gentilmente pelo Dr. Celso Granato do laboratório da UNIFESP em São Paulo.

3.9.4 Variações na concentração do Cloreto de Magnésio

Concentrações de $MgCl_2$ também foram testadas na tentativa de favorecer a reação de PCR, as concentrações testadas na PCR foram: 2,5mM; 3,0mM; 3,5mM nas diluições 10^{-2} e 10^{-3} , para RT-PCR e PCR.

3.9.5 Variações na concentração da enzima *Taq* DNA polimerase

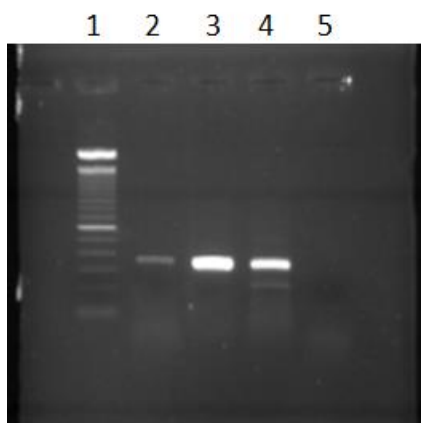
A enzima *taq* polimerase foi testada nas concentrações de 0,8U, 1U e 1,25U, com cDNA na diluição (10^{-1}) também na tentativa de melhorar rendimento na reação.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização da RT-PCR

A RT-PCR foi padronizada com 3 cepas controles de NoV GII, onde podemos observar na figura 8 que a primeira cepa na linha 2 tem uma intensidade menor de brilho da banda de 344 pb, em relação as outras cepas de NoV GII da linha 3 e 4. Isto provavelmente se deve ao fato de que na primeira cepa a concentração de RNA é bem menor que das outras cepas, por isso da importância da otimização da técnica, para tentar melhorar os resultados de amostras com pouco RNA viral.

Figura 8- Resultado da amplificação pela PCR, em gel de agarose a 1,2%, das cepas de controle de NoV.

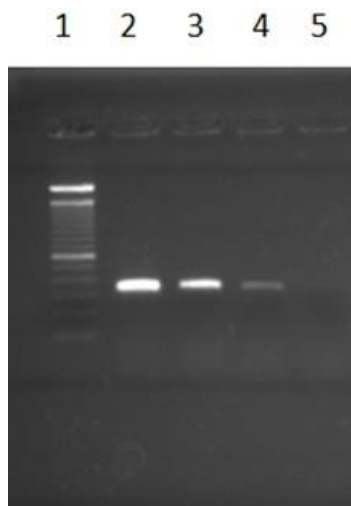


Linha 1- padrão de peso molecular, linha 2-cepa controle GII (1), linha 3- cepa controle GII (2), 4-cepa controle GII (3), 5- amostra negativa.

4.1.1 Limite de detecção

Na figura 9 observamos um exemplo do resultado do limite de detecção para uma cepa controle, onde podemos observar que a maior diluição que se detectou do NoV foi 10^{-3} .

Figura 9 - Amplificação pela PCR das cepas controles diluídas de NoV.

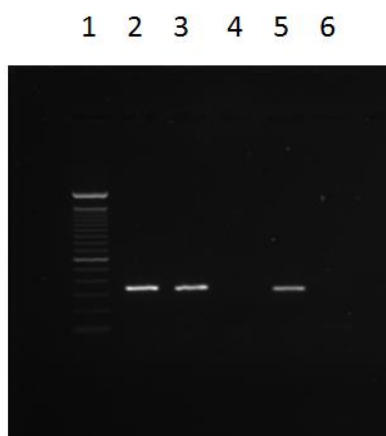


Linha 1- Padrão de peso molecular, linha 2- diluição (10^{-1}), 3 - diluição (10^{-2}), 4 - (10^{-3}), 5 (10^{-4}).

4.1.2 Especificidade Analítica dos primers

Os primers utilizados na reação de RT-PCR mostraram-se específicos para NoV quando testado com cepas controles de outros vírus, pois não ocorreu amplificação de nenhum outro vírus, como exemplificado na figura 10 para a detecção de cepas controles de influenza.

Figura 10- Amplificação de cepas controle de NoV e de cepa controle de Influenza e Rotavírus.

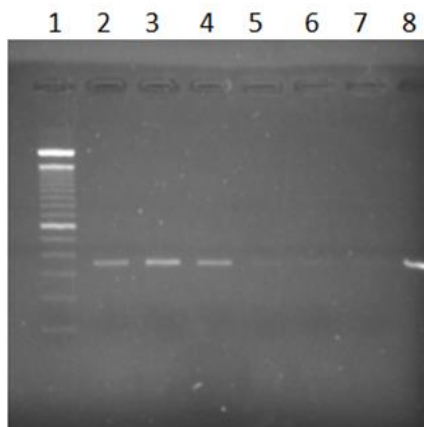


Linha 1-Padrão de peso molecular; 2-cepa controle NoV GII (1); 3-cepa controle NoV GII (2); 4- cepa controle Influenza; 5- cepa controle NoV GII (3); 6-cepa controle Rotavírus.

4.1.3 Variações nas Concentrações do Cloreto de Magnésio

A concentração de $MgCl_2$ que deu maior rendimento a reação foi de 3,0mM na diluição (10^{-2}), conforme mostrado na figura 11.

Figura 11– Amplificação de cepas controles de NoV diluídas usadas na curva de Cloreto de Magnésio

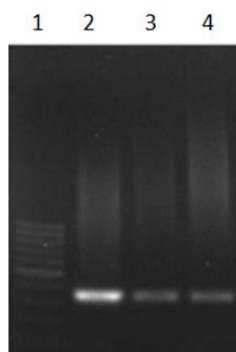


Linha 1- Padrão de peso Molecular, linha 2- $MgCl_2$ 2,5mM (10^{-2}); linha 3- $MgCl_2$ 3,0mM (10^{-2}); linha 4- $MgCl_2$ 3,5mM (10^{-2}); linha 5- $MgCl_2$ 2,5mM (10^3); linha 6- $MgCl_2$ 3,0mM (10^3); linha 7 - $MgCl_2$ 3,5mM (10^3); linha 8 - cepa controle GII (430) pura.

4.1.4 Curva de enzima Taq Polimerase

A concentração de enzima que deu maior rendimento a reação foi a 1,25U/uL, como exemplificado na Figura 12.

Figura 12– Diferentes concentrações da enzima na amplificação de controles de NoV



linha 1- Padrão de peso molecular 2- enzima *Taq* Polimerase 1,25U/uL, 3- enzima *Taq* Polimerase 1.0U/uL, 4- enzima *Taq* Polimerase 0,8U/uL.

4.1.5 Temperatura de Anelamento

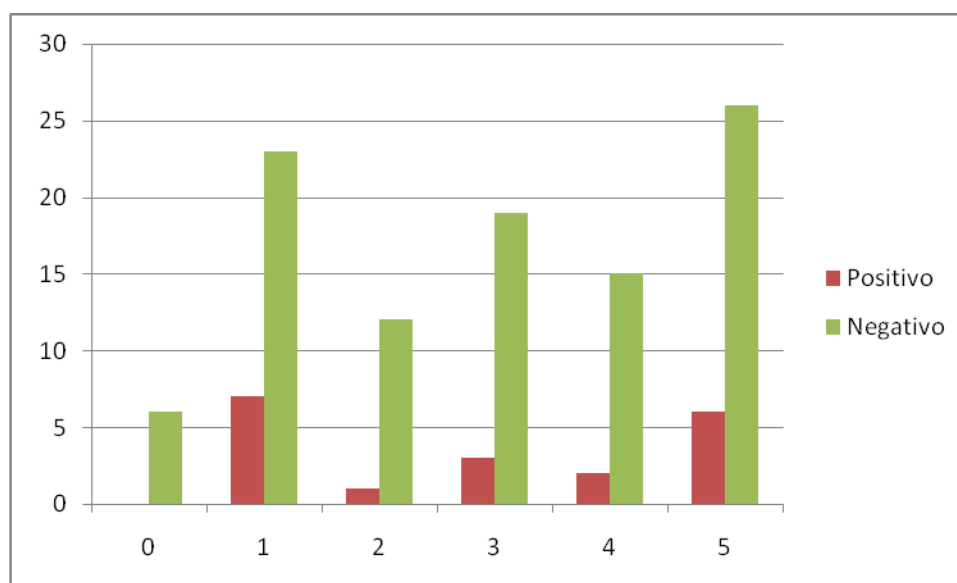
Dentre as diferentes temperatura de anelamento avaliadas, a que resultou em maior eficiência a reação foi a de 55°C.

4.2 Detecção de Norovírus nas amostras incluídas no estudo

Das 120 amostras provenientes de criança de até 5 anos de idade atendidas no sistema de saúde do município de Guarapuava, 50 foram do sexo masculino (41,67%) e 70 foram do sexo feminino (58,33%).

Quanto a idade dos pacientes incluídos no estudo, esta variou de 4 meses a 5 anos e 11 meses, onde podemos observar que as idades de 1 e 5 anos foram a mais coletadas e também que apresentaram maior positividade, conforme figura 13.

Figura 13- Distribuição das idades conforme o resultado do NoV na RT-PCR



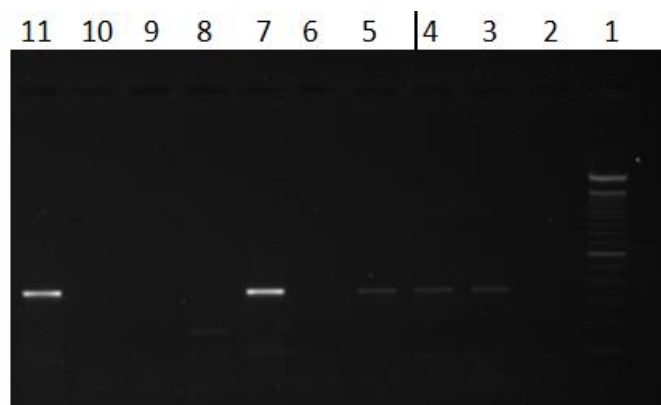
Após a realização RT-PCR em 120 amostras, 19 amostras (15,83%) foram positivas para NoV GII. Entre estes pacientes infectados por NoV, 10 são do gênero feminino (52,63%) e 9 do gênero masculino (47,37%), com uma média de idade de 2,95 anos e mediana 3,0 anos, conforme a tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição das amostras positivas e negativas segundo idade e gênero

Variável	Total	%	Positivo	%	Negativo	%
Masculino	50	41,67	9	47,37	41	40,59
Feminino	70	58,33	10	52,63	60	59,41
Soma	120	100,00	19	100,00	101	100,00
Idade						
0-11m	6	5,00	0	0,00	6	5,94
1a-1a11m	30	25,00	7	36,84	23	22,77
2a-2a11m	13	10,83	1	5,26	12	11,88
3a-3a11m	22	18,33	3	15,79	19	18,81
4a-4a11m	17	14,17	2	10,53	15	14,85
5a-5a11m	32	26,67	6	31,58	26	25,74
Soma	120	100,00	19	100,00	101	100,00
Média	2,92		2,95		2,91	
Mediana	3,00		3,00		3,00	

Abreviações de idade: a, anos; m, meses.

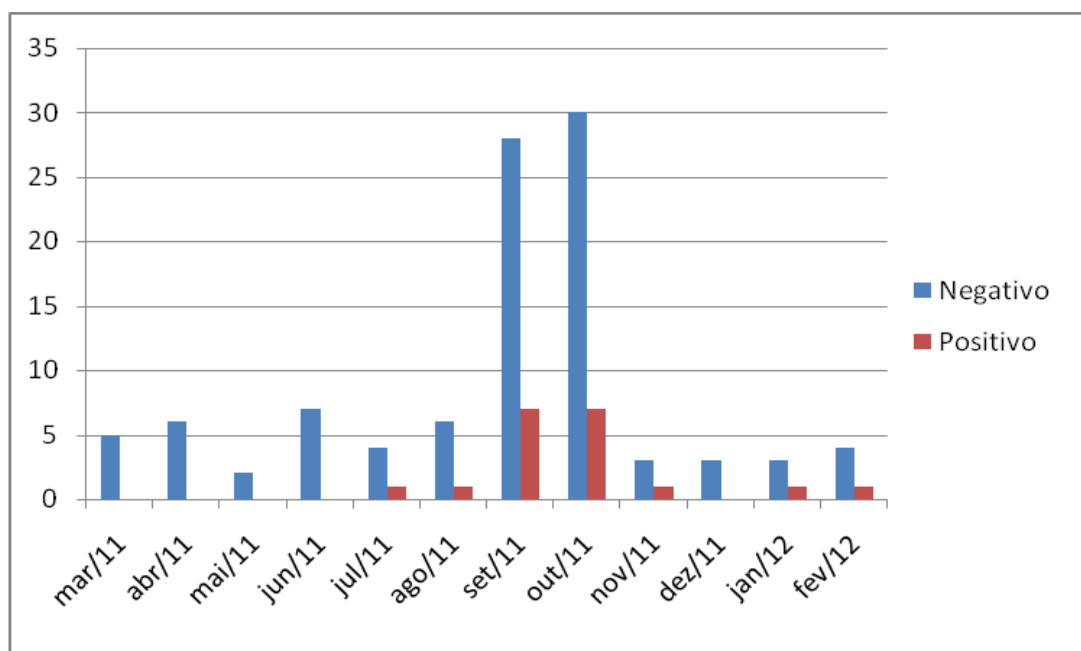
A figura 14 mostra o resultado final da reação de RT-PCR para algumas amostras clínicas dos pacientes realizadas.

Figura 14- Produtos da Amplificação pela PCR (344pb) das amostras em estudo coletadas no município de Guarapuava.

Linha 1- Padrão de peso Molecular; linha 2 – amostra (14) negativa; linha 3 – amostra (15) positiva; linha 4 – amostra (16) positiva; linha 5 – amostra (17) positiva; linha 6 - controle negativo; linha 7 - controle positivo; linha 8 – amostra (18) negativa; linha 9 – amostra (19) negativa; linha 10 – amostra (20) negativa; linha 11 – amostra (21) positiva.

A Figura 15 mostra a distribuição mensal das amostras coletadas, com maior número de casos nos meses de setembro e outubro, conforme o resultado para NoV, com o maior número de casos positivos também ocorrendo com maior frequência nestes meses.

Figura 15- Distribuição mensal das amostras incluídas no estudo, conforme o resultado na detecção para NoV



5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos grandes avanços no combate as gastroenterites tem sido alcançados, a exemplo da vacinação contra rotavírus, contudo esta doença continua causando grande morbidade e mortalidade, representando um problema de saúde pública de impacto mundial. Neste sentido, vários autores tem apontado para o aumento da importância do NoV, que começou a se destacar como o principal agente etiológico das gastroenterites (BUCARDO et al., 2011).

A taxa de detecção de NoV deste estudo foi de 15,83%, (19 positivas em 120 coletadas). Este dado mostra-se semelhante a alguns relatos de estudos de NoV no mundo (FARKAS et al, 2000.; KIRKWOOD & BICHOP, 2001.; BUESA et al, 2002.; HASMAN et al.; 2004). As Norovirose no Brasil ainda são pouco estudadas se comparado com os dados mundiais, os poucos estudos investigam quase exclusivamente pacientes hospitalizados e em ambientes fechados (creches, escolas asilos), faltando estudos na comunidade, o que gera dúvidas sobre como se distribuem estes vírus no ambiente (BARRETO et al.; 2006).

No Brasil, dados publicados na literatura mostram índices variados de positividade para NoV. No Rio de Janeiro, SOARES e colaboradores (2007) detectaram 14,5% (289/42) de infecção em pacientes ambulatoriais e hospitalizados, na qual a taxa de infecção entre os dois ambientes foi semelhante e não sendo descrito um padrão de sazonalidade, pois ocorreu o ano todo. Já Ribeiro e colaboradores (2008), em estudo feito no Espírito Santo com crianças hospitalizadas, mostrou que o NoV teve taxa de infecção superior a de rotavírus, com 39,7% (27/68) versus 20,5% (14/68), respectivamente. A média de idade foi de 5 anos e os meses de maior prevalência de NoV foram maio e junho. Outro estudo realizado em pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná descrevendo co-infecção de adenovírus e norovírus em 14% dos casos (FERREIRA et al., 2012 b).

Estudando crianças frequentadoras de creches, Ferreira e colaboradores (2012) mostraram dados de quinze anos no Rio de Janeiro com a descrição de vários surtos e casos esporádicos de gastroenterite com a detecção de Rotavírus 16,1% (87/539), Norovírus 33,4% (151/452) e Astrovírus 6,3% (19/301). NoV foi o vírus que mais se destacou tanto em surtos como em casos esporádicos e apresentou uma distribuição mensal, mas com maior predomínio no outono e inverno. Em outro estudo, investigando a infecção por NoV em São Paulo, Castilho e colaboradores (2006) detectaram o vírus

em 33,3% (234/78) das crianças sintomáticas e assintomáticas de três hospitais da cidade e da unidade pediátrica de uma universidade pública. Ainda, dados do Instituto Aldofo Lutz descreveram 15,7% de positividade para NoV GII em um surto na cidade de São Paulo (MORILLO et al., 2008).

No presente estudo a mediana de idade em que ocorreram os casos de NoV foi de três anos, igual a mediana do total de crianças investigadas. Como a motivação para a coleta de amostras inclui uma diversidade de apresentações clínicas definida somente como gastroenterites, provavelmente no presente estudo tenhamos incluído amostras de crianças mais sintomáticas. Estudando crianças sintomáticas e assintomáticas, Aragão e colaboradores (2010) encontraram maior positividade em crianças de até 1 ano, com maior risco para infecção assintomática entre menores de 6 meses de idade. Outro estudo que corrobora para isso foi realizado por Neesanant e colaboradores (2013), investigando NoV em crianças sintomáticas e assintomáticas na Tailândia, mostrando 6,8% de positividade em crianças sem diarreia versus 23,8% dentre aquelas crianças com diarreia. As consequências destas infecções, tende a ser diferente, por isso estudos na comunidade podem ter sua taxa de infecção reduzida, como sugerido por Barreira e colaboradores (2010), quando demonstrou que a carga viral nos casos de infectados assintomáticos é menor do que nos sintomáticos. Contudo, a maioria dos estudos que incluem pacientes de diferentes faixas etárias reportam a positividade do NoV em todas as faixas etárias (BORGES et al., 2006; PATEL et al. 2009; FERREIRA et al. 2012), mas este não era objetivo deste estudo que limitou a idade dos pacientes incluídos à 5 anos.

A investigação de etiologia de GA causada por NoV GII em crianças de Guarapuava, mostra que a maioria das amostras positivas ocorreram em setembro e outubro que corresponde aos meses mais coletados. Analisando a frequência mensal, percebemos que não há diferença percentuais entre os meses.

Outra discussão prejudicada pelo modelo de estudo realizado, diz respeito à sazonalidade dos NoV na comunidade de Guarapuava, pois o período de coleta foi curto (1 ano). Estudos com esta finalidade duraram 3 anos, no qual foi descrito a sazonalidade em Belém, norte do Brasil com pico de incidência em (outubro-abril) e picos específicos em (fevereiro e março) (SIQUEIRA et al., 2013). De fato a variação sazonal da infecção por NoV não é bem entendida e muito provavelmente por causa de suas características epidêmicas, relacionadas com questões biológicas e ambientais que regulam a transmissão, virulência e persistência viral na população (ROHAYEM., 2009).

As amostras usadas nesta pesquisa talvez não mostrem a verdadeira sazonalidade deste patógeno no município, por serem amostras de conveniência, solicitada por médicos do sistema de saúde do município para investigação de gastroenterites e também por ser um período curto de estudo .

Embora não tenhamos feito nenhum comparativo de técnicas de PCR, tentamos eliminar ao máximo a possibilidade de ocorrência de resultados falsos positivos e falsos negativos fazendo a otimização da reação e executando os ensaios através das condutas de boas práticas laboratoriais (OLIVEIRA, 2008). Contudo, outro aspecto a ser discutido refere-se a metodologia empregada no estudo para a investigação de NoV. Nos dias atuais existem técnicas de PCR automatizadas, utilizando plataformas de PCR em tempo real, com maior sensibilidade, sendo capaz de detectar somente 10 cópias do transcrito (TRUJILLO et al., 2006). No estudo de Ferreira (2007), a detecção do NoV pela qPCR e pela PCR convencional obtiveram o mesmo percentual de detecção (66%), mostrando que a PCR convencional é uma boa ferramenta para o diagnóstico e pode ser recomendada para investigação de NoV.

Neste estudo o protocolo de RT-PCR que foi utilizado para detecção do NoV, utilizou iniciadores para GII, que é o genogrupo de maior importância relatado em estudos no Brasil e no mundo (VICTÓRIA et al., 2007; FIORETTI et al., 2011; FERREIRA et al., 2012; NEESANANT et al., 2013; LESHEM et al., 2013). Provavelmente isso se deva as diferentes propriedades biológicas entre os genogrupos, como a virulência, a transmissão, ou a estabilidade do vírus no meio ambiente (BUESA et al., 2002).

Este foi o primeiro estudo feito em Guarapuava, que poderá servir como base para se estabelecer medidas de controle, prevenção e diagnóstico de NoV. Mas é necessário continuar a investigação deste vírus, com um número maior de amostras e por um período mais longo, possibilitando obter maiores informações sobre sua ocorrência, e assim determinar a real importância do NoV nas GA.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, conclui-se que através da técnica RT-PCR otimizada no laboratório de Virologia da UNICENTRO, o NoV GII foi detectado em crianças com até cinco anos de idade no Município de Guarapuava, durante o período estudado.

7 REFERÊNCIAS

ANDO, T; NOEL, J.S; FANKHAUSER, R.L. *Genetic classification of “Norwalk-like viruses*. The Journal of infectious Diseases, v.181, n.2, p. 336-348, 2000.

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*. Revista Pan-Amazônica de Saúde, v. 1, p. 149-158, 2010.

ARAGÃO, G.C.; MASCARENHAS, J.D.; KAIANO, J.H.; DE LUCENA, M.S.; SIQUEIRA, J.A.; FUMIAN., T.M.; HERNANDEZ, J.D.; DE 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, n.2, 2013.

ATMAR, R.L.; ESTES, M.K. *Diagnosis of non cultivatable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses*. Clinical Microbiology Reviews, v.14, n.1, p.15-37, 2001.

BARREIRA, D.M.P.G.; FERREIRA, M.S.R.; FUMIAN, T.M.; CHECON, R.; SADOVSKY, A.D.I.; LEITE, J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SPANO, L.C. *Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil*. Journal of Clinical Virology, v. 47, n.1, p. 60-64, 2010.

BARRETO, M.L.; GENSER, B.; STRINA, A.; TEIXEIRA, M.G.; ASSIS, A.M.; REGO, R.F.; TELES, C.A.; PRADO, M.S.; MATOS, S.M.; SANTOS, D.N.; DOS SANTOS, L.A.; CAIRNCROSS, S.; *Effect of city-wide sanitation programme on reduction in rate of childhood diarrhoea in northeast Brazil: assessment by two cohort studies*. Lancet. v.370, n.9599, p.1622-1628, 2007.

BARRETO, M.L.; MILROY, C.A.; STRINA, A.; PRADO, M.S.; LEITE, J.P.; RAMOS, E.A.; RIBEIRO, H.; ALCANTARA-NEVES, N.M.; TEIXEIRA, M.D.A.G.; RODRIGUES, L.C.; RUF, H.; GUERREIRO, H.; TRABULSI, L.R. *Community-based monitoring of diarrhea in urban Brazilian children: incidence and associated pathogens*. Transactions of the Royal Society the Tropical Medicine of Hygiene. v.100, n.3, p. 234-242, 2006.

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

BELLIOT, G.; SOSNOVTSEV, S.V.; CHANG, K.; MCPHIE, P.; GREEN, K.Y. *Nucleotidylation of the VPg Protein of a Human Norovirus by its Proteinase-Polymerase Precursor Protein*. *Virology*, v.374, n.1, p. 33–49, 2008.

BERG, D.E.; KOHN, M.A.; FARLEY, T.A.; MCFARLAND, L.M. *Multi-State Outbreaks of Acute Gastroenteritis Traced to Fecal-Contaminated Oysters Harvested in Louisiana*. *The Journal of Infectious Diseases*. v.181, n.2, p.381-386, 2000.

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*. *Journal of Virology*, v.77, n.21, p.11603-11615, 2003.

BOK, K.; PRIKHODKO, V.G.; GREEN, K.Y.; SOSNOVTSEV, S.V. *Apoptosis in Murine Norovirus-Infected RAW264.7 Cells Is Associated with Down regulation of Survivin*. *Journal of Virology*, v.83, n.8, p.3647–3656, 2009.

BORGES, A.M.; TEIXEIRA, J.M.S.; COSTA, P.S.S.; GIUGLIANO, L.G.; FIACCADORI, F.S.; FRANCO, R.C.; BRITO, W.M.E.D.; LEITE, J.P.G.; CARDOSO, D.D.P. *Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n.7, p. 721-724, 2006.

BRYCE, J.; BLACK, R.E.; WALKER, N.; BHUTTA, Z.A.; LAWN, J.E.; STEKETEE, R.W. *Can the word afford save the lives of million children each year?* *Lancet*. v.365, n. 9478, p.2193-2200, 2005.

BUCARDO, F.; LINDGREN, P.E.; SVENSSON, L.; NORDGREN, J. *Low Prevalence of Rotavirus and High Prevalence of Norovirus in Hospital and Community Wastewater after Introduction of Rotavirus Vaccine in Nicaragua*. *PLoS ONE*, v.6, n.10, 2011.

BUESA, J.; COLLADO, B.; LÓPEZ-ANDÚJAR, P.; ABU-MALLOUH, R.; RODRIGUES-DÍAZ, J.; GARCÍA-DÍAZ, A.; PRAT, J.; GUIX, S.; LLOVET, T.; PRATS, J.; BOSH, A.E. *Epidemiologia molecular de calicivírus causando surtos e casos esporádicos de gastroenterite aguda em Espanha*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.8, p.2854-2859, 2002.

BULL, R.A.; TU, E.T.V.; WHITE, P.A. *Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.2, p.327-333, 2006.

CAO, S.; LOU, Z.; TAN, M.; CHEN, Y.; LIU, Y.; ZHANG, Z.; ZHANG, X.C.; JIANG, X.; LI, X.; RAO, Z. *Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus*. Journal of Virology, v.81, n.11, p.5949-5957, 2007.

CASTILHO, J.G.; MUNFORD, V.; RESQUE, H.R.; NETO, U.F.; VINJÉ, J.; RÁCZ, M.L. *Diversidade genética de norovírus em crianças com gastroenterite no Estado de São Paulo, Brasil*. Journal of Microbiology, v.44, n.11, p.3947-3943, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC *Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines*. MMWR, v.60, p.1-1, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC *Norwalk-like viruses public health consequences and outbreak management*. MMWR, v.50, n.9, p.1-17, 2001.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVC). Secretária de Saúde do Estado de São Paulo. *Vigilância Epidemiológica. Informe Net Dta*, 2010.

CHEETHAM, S.; SOUZA, M.; MEULIA, T.; GRIMES, S.; HAN, M.G.; SAIF, L.J. *Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs*. Journal of Virology, v.80, n.21, p.10372-10381, 2006.

CHEN, R.; NEILL, J.D.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V. *X-RAY structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v.103, n.21, p.8048-8053, 2006.

CENTRO DE INFORMAÇÕES E RESPOSTAS ESTRATÉGICAS DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE CIEVS - INFORME EPIDEMIOLÓGICO PARANÁ EVENTOS - Semana Epidemiológica 01/2013.

CILLI, A.; LUCHS, A.; MORILLO, S.G.; COSTA, F.F.; CARMONA, R.C.; TIMENETSKY, M.C.S.T. *Characterization of rotavirus and norovirus strains: a 6-year study (2004-2009)*. Jornal de Pediatria, v. 87, n. 5, p. 445-449, 2011.

DAUGHENBAUGH, K.; FRASER, C.S.H.J.W.; HARDY, M.E. *The genome linked protein VPg of the Norwalk virus binds to IF3*. Embo Journal, v.22, n.11, p. 2852-2859, 2003.

DOLIN, R.; BLACKLOW, N.R.; DUPONT, H.; FORMAL, S.; BUSCHO, R.F.; KASEL, J.A.; CHAMES, R.P.; HORNICK, R.; CHANOCK, R.M. *Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates*. 1971. *The Journal of Infectious Diseases*, v.11, n.189, p.2142-2147, 2004.

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

DONALDSON, E.F.; LINDESMITH, L.C.; LOBUE, A.D.; BARIC, R.S. *Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations*. *Immunological Reviews*, v.225, n.1, p.190-211, 2008.

ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z.; *Rotaviruses and their replication*. In *Fields Virology*. Edited by Knipe, D.M. & Howley, P.M. 5th edition; 2007.

ESTES, M.K.; PRASAD, B.V.; ATMAR, R.L. *Noroviruses everywhere: has something changed?* *Current Opinion in Infectious Diseases*. v.19, n.5, 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*. *Journal of Virology*, v.77, n.21, p.11790-11797, 2003.

FARKAS, T., JIANG, X., GUERRERO, M.L., ZHONG, W., WILTON, N., BERKE, T., MATSON, D.O., PICKERING, L.K., RUIZ-PALACIOS G. *Prevalence and genetic diversity of human caliciviruses (HuCVs) in Mexican children*. *Journal of Medical Virology*, v.62, n.2, p.217-223, 2000.

FERREIRA, M.S.R.; XAVIER, M.D.P.T.P.; TINGA, A.C.D.C.; ROSE, T.L.; FUMIAM, T.M.; FIALHO, A.M.; ASSIS, R.M.D.; COSTA, F.A.C.; OLIVEIRA, S.A.D.; LEITE, J.P.G.L.; MIAGOSTOVICH, M.P. *Assessment of Gastroenteric Viruses Frequency in a Children's Day Care Center in Rio De Janeiro, Brazil: A Fifteen Year Study (1994-2008)*. *PLoS ONE*, v.7, n.3, 2012.

FERREIRA, M.S.R. *Detecção e Caracterização molecular de Norovírus em casos de gastroenterites agudas ocorridos na região do médio Paraíba, Estado do Rio de Janeiro*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense. Centro de Ciências Médicas. Faculdade de Medicina. Programa de Pós Graduação de Medicina, 2007.

FIORETTI, J. M.; FERREIRA, M. S. R.; VICTORIA, M.; VIEIRA, C. B.; XAVIER M.D.A.T.P.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. *Genetic diversity of noroviruses in Brazil*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.106, n.8, p.942-947, 2011.

FRENCK, R.; BERNSTEIN, D.I.; XIA, M.; HUANG,P.; ZHONG, W.; PARKER, S.; DICKEY, M.; MCNEAL, M.; JIANG, X. *Predicting susceptibility to norovirus GII.4 by use of a challenge model involving humans*. Journal of Infectious Diseases. v.206, n.9, p.1386-1393, 2012.

FISCHER WALKER, C.L.; PERIN, J.; ARYEE, M.J.; BOSCHI-PINTO, C.; BLACK, R.E. *Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review*. BMC Public Health, v.12, n.220, p.1-15, 2012.

GLASS, P.J.; WHITE, L.J.; BALL, J.M.; LEPARC-GOFFART, I.; HARDY, M.E.; ESTES, M.K. *Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein*. The Journal of virology, v.74, n.14, p.6581-6591, 2000.

GLASS, P.J.; ZENG, C.Q.; ESTES, M.K. *Two nonoverlapping domains on the Norwalk virus open reading frame 3 (ORF 3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35 K protein and in ORF3- capsid protein interactions*. The Journal of Virology, v.77, n.6, p.3569-3577, 2003.

GLASS, R. I.; BRESEE, J.; JIANG, B.; GENTSCH, J.; ANDO, T.; FRANKHAUSER, R.; NOEL, J.; PARASHAR, U.; ROSEN, B.; MONROE,S.S. *Gastroenteritis viruses: an overview*. Novartis Foundation Symposium. v.238, p.5-19, 2001.

GOODGAME, R. *Norovirus Gastroenteritis*. Current Infections Disease Reports, v.9, p.102-109, 2007.

GORDAN, I.; PATTERSON, P.R.; WHITNEY, E. *Immunity in volunteers recovered from nonbacterial gastroenteritis*. The Journal of Clinical Investigation, v.35, n.2, p.200-205, 1956.

GREEN, K.Y.; ANDO, T.; BALAYAN, M.S.; BERKE, T.; CLARKE, I.N.; ESTES, M.K.; MATSON, D.O.; NAKATA, S.; NEILL, J.D.; STUDDERT, M.J.; THIEL, H.J. *Taxonomy of the caliciviruses*. The Journal of Infectious Diseases, v.181, n.2, p.322-330, 2000.

GREEN, K.Y. *Caliciviridae: The Noroviruses*. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, v.1, p. 949-979, 2007.

GUARINO, A.; ALBANO, F.; ASHKENAZI, S.; GENDREL, D.; HOEKSTRA, J.H.; SHAMIR, R.; SZAJEWSKA, H.; ESPGHAN/ESPID. *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe*. Journal of Pediatric of gastroenterology and Nutrition, v.46, n.5, p.619-621, 2008.

GUNSON, R.N.; MILLER, J.; CARMAN, W.F. *Comparison of real-time PCR and EIA for the detection of outbreaks of acute gastroenteritis caused by norovirus*. Communicable disease and public health, v.6, n.4, p.297-299, 2003.

GURGEL, R.Q.; CORREIA, J.B.; CUEVAS, L.E. *Effect of rotavirus vaccination on circulating virus strains*. Lancet, v.371, n.9609, p.301-302, 2008.

HALE, A.D.; TANAKA, T.N.; KITAMOTO, N.; CIARLET, M.; JIANG, X.; TAKEDA, N.; BROWN, D.W.; ESTES, M.K. *Identification of an epitope common to genogroup I "Norwalk-like viruses"*. Journal of Clinical Microbiology, v. 38, n.4, p.1656-60, 2000.

HALL, A.J.; VINJÉ, J.; LOPMAN, B.; PARK, G.W.; YEN, C.; GREGORICUS, N.; PARASHAR, U. *Updated Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines*. Morbidity and Mortality Weekly Report, v.60, n.3, 2011.

HALL, A.J.; LOPMAN, B.A.; PAYNE, D.C.; PATEL, M.M.; GASTAÑADUY, P.A.; VINJÉ, J.; PARASHAR, D.U. *Norovirus disease in the United States*. Emerging Infectious Diseases, v.19, n.8, p.1198-1205, 2013.

HANSMAN, G.S.; KATAYAMA, K.; MANEEKARN, N.; PEERAKOME, S.; KHAMRIN, P.; TONUSIN, S.; OKITSU, S.; NISHIO, O.; TAKEDA, N.; USHIJIMA, H. *Diversidade genética de norovírus e saporovírus em crianças hospitalizadas com casos esporádicos de gastroenterite aguda em Chiang Mai, na Tailândia*. Journal of Clinical Microbiology, v.42, n.3, p.1305-1307, 2004.

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

HARRINGTON, P.R. ; LINDESMITH, L. ; YOUNT, B.; MOE, C.L.; BARIC, R.S. *Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice.* Journal of Virology, v.76, n.23, p.12335–12343, 2002.

HERRMANN, J.E.; TAYLOR, D.N.; ECHEVERRIA, P, BLACKLOW, N.R. *Astrovirus as a cause of gastroenteritis in children.* New England Journal of Medicine v.324, n.25, p. 1757-1760,1991.

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.

HUTSON, A.M.; ATMAR, R.L.; GRAHAM, D.Y.; ESTES, M.K. *Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type.* Journal of Infectious Diseases, v. 185, n.9, p. 1335–1337, 2002.

HYSER, J. M.; ESTES, M.K. *Rotavirus vaccines and pathogenesis: 2008.* Current Opinion Gastroenterology, v.25, n.1, p.36-43, 2009.

JIANG, X.; WANG, J.; GRAHAM, D.Y.; ESTES, M .K. *Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction.* Journal of Clinical Microbiology, v.30, n.10, p.2529-2534, 1992.

JIANG, X.; WANG, M.; WANG, K.; ESTES, M.K. *Sequence and genomic organization of Norwalk virus.* Virology, v.195, n.1, p.51-61, 1993.

JORDAN, W.S.; GORDON, I. *A study of illness in a group of Cleveland families VII. Transmission of acute nonbacterial gastroenteritis to volunteers: Evidence for two different etiological agents.* Journal of Experimental Medicine, v.98, n.5, p.461-475, 1953.

JUNQUERA, C.G.; DE BARANDA, C.S.; MIALDEA, O.G.; SERRANO, E.B.; SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. *Prevalence and clinical characteristics of norovirus gastroenteritis among hospitalized children in Spain.* The Pediatric Infectious Diseases Journal, v.28, n.7, p.604-607, 2009.

KAPIKIAN, A.Z. *The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective.* Journal of Infectious Disease, v.181, n.2, p. 295-302, 2000.

KAPIKIAN, A.Z.; WYATT,R.G.; DOLIN,R.; THORNHILL,T.S.; KALICA,A.R.; CHANOCK,R.M. *Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis*. Journal of Virology, v.10, n.5, p.1075-1081, 1972.

KARST, S.M. *Pathogenesis of Noroviruses, Emerging RNA*. Viruses, v.2, n.3, p748-781, 2010.

KIRKWOOD, C.D.; BISHOP, R.F.E. *A detecção molecular de calicivírus humano em crianças pequenas hospitalizadas com gastroenterite aguda em Melbourne, Austrália, em 1999*. Journal of Clinical Microbiology, v.39, n.7, p. 2722-2724, 2001.

KIRKWOOD, C.D.; STREITBERG, R. *Calicivirus shedding in children after recovery from diarrhoeal disease*. Journal of Clinical. Virology, v.43, n.3, 346–348, 2008.

KITTIGUL, L.; POMBUBPA, K.; TAWEEKATE, Y.; YEEPHOO, T.; KHAMRIN, P.; USHIJIMA, H. *Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapovirus, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand*. Journal of Medical Virology, v.81, n.2, p.345-353, 2009.

KOJIMA, S.; KAGEYAMA,T.; FUKUSHI, S.; HOSHINO, FB.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; NATORI, K.; TAKEDA, N.; KATAYAMA K. *Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses*. Journal of Virological Methods, v.100, n.1-2, p.107-114, 2002.

KRONEMAN, A.; HARRIS, J.; VENNEMA, H.; DUIZER, E.; VAN, DUYNHOVEN Y.; GRAY, J.; ITURRIZA, M.; BÖTTIGER, B.; FALKENHORST, G.; JOHNSEN, C.; VON, BONSDORFF CH.; MAUNULA, L.; KUUSI, M.; POTHIER, P.; GALLAY, A.; SCHREIER, E.; KOCH, J.; SZÜCS, G.; REUTER, G.; KRISZTALOVICS, K.; LYNCH, M.; MCKEOWN, P.; FOLEY, B.; COUGHLAN, S.; RUGGERI, FM.; DI BARTOLO, I.; VAINIO, K.; ISAKBAEVA,E.; POLJSAK-PRIJATELJ, M.; GROM, AH.; BOSCH, A.; BUESA, J.; FAUQUIER, AS.; HERNANDÉZ-PEZZI ,G.; HEDLUND, KO.; KOOPMANS, M. *Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses*. Journal of Public Health. v.30, n.1, p.82-90, 2008.

LE PENDU, J; RUVOEN-CLOUET, N; KINDBERG, E; SVENSSON, L. *Mendelian resistance to human norovirus infections*. Seminars in Immunology, v.18, n.6, p.375-86, 2006.

LEE, N.; CHAN, M.C.; WONG, B.; CHOI, K.W.; SIN, W.; LUI, G.; CHAN, P.K.; LAI, R.W.; COCKRAM, C.S.; SUNG, J.J.; LEUNG, W.K. *Fecal viral concentration and diarrhea in norovirus gastroenteritis*. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, n.9 p.1399-1401, 2007.

LESHEM, E.; WIKSWO, M.; BARCLAY, L.; BRANDT, E.; STORN, W.; SALEHI, E.; DE SALVO, T.; DAVIS, T.; SAUAP, A.; DOBBINS, G.; BOOTH, A.H.; BIGGS, C.; GARMAN, K.; WORON, M.A.; PARASHAR, D.U.; VINJÉ, J.; HALL, J.A. *Effects and Clinical Significance of GII.4 Sydney Norovirus, United States, 2012–2013*. *Emerging Infectious Diseases*, v.19, n.8, 2013.

LEVIDIOTOU, S.; GARTZONIKA, C.; PAPAVENTSIS, D.; CHRISTAKI, C.; PRIAVALI, E.; ZOTOS, N.; KAPSALI, E.; VRIONI, G. *Viral agents of acute gastroenteritis in hospitalized children in Greece*. *Clinical Microbiology and Infection*, v.15, n.6, p.596–598, 2009.

LINDESMITH, L.C.; DONALDSON, E.F.; LOBUE, A.D.; CANHÃO, J.L.; ZHENG, D.P.; VINJE, J.; BARIC, R.S. *Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations*. *PLoS Med*, v.5, n.2, 2008.

LINDESMITH, L.C.; DONALDSON, E.; LEON, J.; MOE, C.L.; FRELINGER, J.A.; JOHNSTON, R.E.; WEBER, D.J.; BARIC, R.S. *Heterotypic humoral and cellular immune responses following Norwalk virus infection*. *Journal of Virology*, v.84, n.4, p.1800-1815, 2010.

LINDESMITH, L.C.; DONALDSON, E.F.; BARIC, R.S. *Norovirus GII.4 strain antigenic variation*. *Journal of Virology*, v.85, n.1, p.231–242, 2011.

LIU, L.; JOHNSON, H.L.; COUSENS, S.; PERIN, J.; SCOTT, S.; LAWN, J.E.; RUDAN, I.; CAMPBELL, H.; CIBULSKIS, R.; LI, M.; MATHERS, C.; BLACK, R.E. *Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000*. *Lancet*, v.379, n.9832, p.2151–2161, 2012.

LOCHRIDGE, V.P.; HARDY, M.E. *Snow Mountain virus genome sequence and virus-like particle assembly*. *Virus Genes*, v.26, n.1, p.71-82, 2003.

LOPMAN, B.A.; REACHER, M.H.; VIPOND, I.B.; SARANGI, J.; BROWN, D.W. *Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings*. *Clinical Infectious Diseases*, v.39, n.3, p.318-324, 2004.

MAGWALIVHA, M.; WOLFAARDT, M.; KIULIA, N.M.; VAN ZYL, W.B.; MWENDA, J.M.; TAYLOR, M.B. *High prevalence of species D human adenoviruses in fecal specimens from Urban Kenyan children with diarrhea*. Journal of Medical Virology, v.82, n.1,p .77-84, 2010.

MANUAL DE MONITORIZAÇÃO DA DOENÇA DIARRÉICA AGUDA- MDDA/DDTHA/CVE-SES/SP. São Paulo (SP); 2002. MMDA: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1549.

MONITORIZAÇÃO DAS DOENÇAS DIARREICAS AGUDAS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Brasília, 2008.

MARIONNEAU, S.; RUVOËN, N.; LE MOULLAC-VAIDYE, B.; CLEMENT, M.; CAILLEAU-THOMAS, A.; RUIZ-PALACOIS, G.; HUANG, P.; JIANG, X.; LE PENDU, J. *Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals*. Gastroenterology, v.122, n.7, 1967–1977, 2002.

MATSUI, S.M. AND GREENBERG, H.B. *Astroviruses*. In Fields Virology ed. FIELDS, B.N, KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., GRIFFIN, D.E., MARTIN, M.A., LAMB, R.A., ROIZMAN, B. and STRAUS, S.E. p. 875–893. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.p.875-893, 2001.

MAUNULA, L.; KALSO, S.; VON BONSDORFF,C.H.; PÖNKÄ, A. *Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak*. Epidemiology and Infections, v.132, n.4, p.737-743, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

MMWR.Updatednorovirus outbreak management and disease prevention guidelines. MMWR. v.60 (RR-3), p.1-18, 2011.

MORILLO, S.G.; CILLI, A.; CARMONA, RDE.C.; TIMENETSKY, MDO. C. *Identification and molecular characterization of norovirus in São Paulo State, Brazil*. Brazilian. Journal of Microbiology, v.39, n.4, p.619-622, 2008.

MORILLO, S.G.; LUCHS, A.; CILLI, A.; RIBEIRO, C.D.; CALUX, S.J.; CARMONA, RDE. C.; TIMENETSKY, M.D.O. C. *Norovirus 3rd Generation kit: an improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection*. Journal of Virological Methods, v.173, n.1, p.13-16, 2011.

MOUNTS, A.W.; ANDO, T.; KOOPMANS, M.; BREESE, S.J.; NOEL, J.; GLASS, I.R. *Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk like viruses*. Journal of Infectious Diseases, v.181, n.2, p.284-287, 2000.

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

NAKANISHI, K.; TSUGAWA, T.; HONMA, S.; NAKATA, S.; TATSUMI, M.; YOTO, Y.; TSUTSUMI, H. *Detection of enteric viruses in rectal swabs from children with acute gastroenteritis attending the pediatric outpatient clinics in Sapporo, Japan*. Journal of Clinical Virology, v.46, n.1, p.94-97, 2009.

NEESANANT, P.; SIRINARUMITR, T.; CHANTAKRUC, S.; BOONYAPRAKOB, U.; CHUWONGKOMOND, K.; BODHIDATTAB, L.; SETHABUTR, O.; ABENTEB, J.E.; SUPAWATE, K.; MASON, C.J. *Optimization of one-step real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for norovirus detection and molecular epidemiology of noroviruses in Thailand*. Journal of Virological Methods, v.199, n.1-2, p.317-325, 2013.

NURMINEN, K.; BLAZEVIC, V.; HUHTI, L.; RÄSÄNEN, S.; KOHO, T.; HYTÖNEN, V.P.; VESIKARI, T. *Prevalence of norovirus GII-4 antibodies in Finnish children*. Journal of Medical Virology, v.83, n.3, p.525-531, 2011.

OH, D.Y.; GAEDICKE, G.; SCHREIER, E. *Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity*. Journal of Medical Virology, v.71, n.1, p.82-93, 2003.

OKHUYSEN, P.C.; JIANG, X.; YE, L.; JOHNSON, P.C.; ESTES, M.K. *Viral shedding and fecal IgA response after Norwalk virus infection*. Journal of Infectious Diseases, v.171, n.3, p.566-569, 1995.

OLIVEIRA, A.E.P.C. *Controle e Garantia de Qualidade da Técnica de PCR* Universidade do Porto. Faculdade de Farmácia. Mestrado de Controle de Qualidade, 2008.

PARASHAR, U. D.; HUMMELMAN, E.J.; BRESEE, J.D.; MILLER, M.A.; GLASS, R.I. *Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children*. Emerging Infectious Diseases, v.9, n.5, 565-571, 2003.

PARASHAR, U.D.; BRESEE, J.S.; GLASS, R.I. *The global burden of diarrhea disease in children*. Bulletin of the World Health Organization, v.81, n.4, 2003.

PARASHAR, U. D.; GIBSON, C.J.; BRESSE, J.D.; GLASS, R.I. *Rotavirus and severe childhood diarrhea*. Emerging Infectious Diseases, v.12, n.2, p.304-306, 2006.

PATEL, M. M.; WIDDOWSON, M.A.; GLASS, R.I.; AKAZAWA, K J.; VINJE, J.; PARASHAR, U.D. *Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis*. Emerging Infectious Diseases, v.14, n.8, p.1224-1231, 2008.

PATEL, M.M.; HALL, A.J.; VINJÉ, J.; PARASHAR. U.D. *Norovirus: a comprehensive review*. Journal of Clinical Virology, v. 44, n.1 p.1-8, 2009

PEREIRA, I.V.; CABRAL, I.E. *Diarreia aguda em crianças menores de um ano: subsídios para o delineamento do cuidar*. Escola Anna Nery Revista de Enfermagem, v.12, n.2, p.224-229, 2008.

PIESCIK-LECH, M.; SHAMIR, R.; GUARINO, A.; SZAJEWSKA, H. *Review article: the management of acute gastroenteritis in children*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics. v.3, n.3, p. 289–303, 2013.

PRASAD, B.V.; HARDY, M.E.; DOKLAND, T.; BELLA, J.; ROSSMANN, M.G.; ESTES, M.K. *x-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid*. Science, v.286, n.5438, p.287-290, 1999.

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, n.4, p.232-238, 2003.

REIMANN, H.A.; HODGES, J.H.; PRICE, A.H. *Epidemic diarrhea, nausea, and vomiting of unknown cause*. Journal of the American Medical Association, v.127, n.1, p.1-6, 1945a.

REIMANN, H.A; HODGES, J.H; PRICE,A.H. *The cause of epidemic diarrhea, nausea, and vomiting (viral dysentery?)*. Experimental Biology and Medicine, v.59, p.8-9, 1945b.

RIBEIRO, L.R.; GIUBERTI,R.S.O.; BARREIRA, D.M.P.G.; SAICK, K.W.; LEITE, J.P.G, MIAGOSTOVICH, M.P.; SPANO, L.C. *Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.103, n.2, p.201-206, 2008.

ROBERTS, L.O.; AL-MOLAWI, N.; CARTER, M.J.; KASS, G.E.N. *Apoptosis in Cultured Cells Infected with Feline Calicivirus*. Annals of the New York Academy of Sciences, v.1010, p.587–590, 2003.

ROCKX, B.; DE WIT, M.; VENNEMA, H.; VINJÉ, J.; DE BRUIN, E.; VAN DUYNHOVEN, Y.; KOOPMANS, M. *Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study*. Clinical Infectious Disease, v.35, n.3, p. 246-253, 2002.

ROHAYEM, J 2009. *Norovirus seasonality and the potential impact of climate change*. Clinical of Microbiology Infectious, v. 15, p.524-527, 2009.

ROHAYEM, J.; ROBEL, I.; JAGER, K.; SCHEFFLER, U.; RUDOLPH, W. *Protein-Primed and De Novo Initiation of RNA Synthesis by Norovirus*. Journal of Virology, v. 80, n.14, p.7060-7069, 2006.

RONVEAUX, O.; VOS, D.; BOSMAN, A.; BRANDWIJK, K.; VINJE, J.; KOOPMANS, M.; REINTJES, R. P. *An outbreak of Norwalk like virus gastroenteritis in a nursing home in Rotterdam*. Euro Surveillance, v.5, n.5, p.54-57, 2000.

RYDELL, G.E.; KINDBERG, E.; LARSON, G.; SVENSSON, L. *Susceptibility to winter vomiting disease: a sweet matter*. Reviews in Medical Virology, v.21, n.6, p.370–382, 2011.

SCALLAN, E.; GRIFFIN, P.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; HOEKSTRA, R.M *Foodborne illness acquired in the United States – unspecified agents*. Emerging Infections Diseases, v.17, n.1, p.16-22, 2011.

SIQUEIRA, J.A.; LINHARES, A.D.A.C.; GONÇALVES, M. S.; DE CARVALHO, T.C.; JUSTINO, M.C.; MASCARENHAS, J.D.; GABBAY, Y.B. *Group A rotavirus and norovirus display sharply distinct seasonal profiles in Belém, northern Brazil*. Memória do Instituto Oswaldo Cruz, v.108, n.5, p.661-664, 2013.

SOARES, C.C.; SANTOS, N.; BEARD, R.S.; ALBUQUERQUE, M.C.M.,; MARANHÃO, A.G.; ROCHA, L.N.; RAMÍREZ, M.L.; MONROE, S.S.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J. *Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil*. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, n.8, p.1244-1246, 2007.

SOSNOVTSEV, S.V.; PRIKHOD'KO, E.A.; BELLLOT, G.; COHEN, J.I.; GREEN, K.Y. *Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells*. *Virus Research*. v.94, n.1, p.1-10, 2003.

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

TAN, M.; JIANG, X. *Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle*. *Trends in Microbiology*, v.13, n.6, p.285-293, 2005.

TAN, M; HUANG, P; MELLER, J; ZHONG, W; FARKAS,T; JIANG,X. *Mutations whitening the P2 domain of Norovirus capsid affect binding to human histoblood group antigens:evidence for abinding pocket*. *Journal of Virology*, v.77, n.23, p.12562-12571, 2003.

THONGPRACHUM, A.; KHAMRIN, P.; CHAIMONGKOL, N.; MALASAO, R.; OKITSU, S.; MIZUGUCHI, M.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. *Evaluation of an immunochromatography method for rapid detection of noroviruses in clinical specimens in Thailand*. *Journal of Medical Virology*, v.82, n.12, p.2106-2109, 2010.

TRANG, N.V.; VU, H.T.; LE, N.T.; HUANG, P.; JIANG, X.; ANH, D.D *Association between norovirus and rotavirus infection and histo-blood group antigen types in vietnamese children*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014. [Epub ahead of print]

TROEGER, H.; LODDENKEMPER, C.; SCHNEIDER, T.; SCHREIER, 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, n.8, p.1070-1077, 2008.

TRUJILLO, A.A.; MCCAUSTLAND, K.A.; ZHENG, P.D.; HADLEY, L.A.; VAUGHN, G.; ADAMS, S.M.; ANDO, T.; GLASS, R.I.; MONROE, S.S. *Use of TaqMan Real-Time Reverse Transcription-PCR for Rapid Detection, Quantification, and Typing of Norovirus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.4, p. 1405-1412, 2006.

TU, E.T.; BULL, R.A.; KIM, M.J.; MCIVER, C.J.; HERON, L.; RAWLINSON, W.D.; WHITE, P.A. *Norovirus excretion in an aged-care setting*. Journal Clinical of Microbiology, v.46, n.6, p.2119-2121, 2008.

TUAN ZAINAZOR, T.C.; AFSAH-HEJRI, L.; NOOR HIDAYAH, M.S.; NOORELIZA, M.R.; NAZIEHAH, M.D.; TANG, J.Y. H.; NOORLIS, A., ELEXSON, N.; CHAI, L.C.; GHAZALI, F.M.; CHEAH, Y. K.; SON, R. *Assessment of Noroviruses in selected Ulam from local market in Malaysia*. International Food Research Journal, v. 19, n. 3, p. 877-882, 2012.

VICTORIA, M.; CARVALHO COSTA, F.A.; HEINEMANN, M.B.; LEITE, J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P. *Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004*. Journal of Pediatric Infections Disease, v.26, n.7, p.602-606, 2007.

VICTORIA, M.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; CORRÊA, D.A.; KOLESNIKOVAS, C.; LEITE, J.P.G.; MIAGOSTOVICH, M.P.; BARARDI, C.R.M. *Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil*. Journal of Applied Microbiology, v.109, n.1, p.1-8, 2009.

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*. Journal of Virological Methods, v.116, n.2, p.109-117, 2004.

WALKER, C.L.; ARYEE, M.J.; BOSCHI-PINTO, C.; BLACK, R.E. *Estimating diarrhea mortality among young children in low and middle income countries*. PLoS One, v.7, n.1, 2012.

WANG, Q.H.; COSTANTINI, V.; SAIF, L.J. *Porcine enteric caliciviruses: Genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology*. Vaccine, v.25, n.30, p.5453-5466, 2007.

WESTHOFF, T.H.; VERGOULIDOU, M.; LODDENKEMPER, C.; SCHWARTZ, S.; HOFMANN, J.; SCHNEIDER, T.; ZIDEK, W.; VAN DER GIET, M. *Chronic norovirus infection in renal transplant recipients*. Nephrology Dialysis Transplantation. v.24,n.3, p.1051-1053, 2009.

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SANCHEZ-FAUQUIER, A. *Viruses causing gastroenteritis*. Clinical Microbiology and Infection, v. 9, n. 4, p.247-262, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO. Diarrhoeal Diseases Disponível em:
<http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index1.html>
Acessado em 29 maio 2012

WORLD HEALTH REPORT. World Health Organization. Disponível em:
<<http://www.who.int/whr/2005/en/>>. Acessado em 12 nov 2013.

ZHENG, D.P.; ANDO, T.; FANKHAUSER, R.L.; GLASS, R.I.; MONROE, S.S.
Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, v.346, n.2, p.312-323, 2006.

ZINTZ, C.; BOK, K.; PARADA, E.; BARNES-ELEY, M.; BERKE, T.; STAAT, M.A.;
AZIMI, P.; JIANG, X.; MATSON, D.O. *Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States*. *Infection, Genetics and Evolution*, v.5, n.3, p. 281–290, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um estudo que tem por objetivo investigar a infecção de norovírus no município de Guarapuava, PR.

Para a participação da criança neste estudo você, responsável, deverá autorizar que a amostra de fezes já coletada, seja utilizada para detecção de norovírus. Se concordar em participar garantimos sigilo das informações e não o aparecimento do nome da criança nem seu nome. Sua participação é voluntária, o Sr (a) não terá nenhum tipo de despesa em participar da pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. O Sr (a) tem liberdade de participar do estudo ou desistir a qualquer momento. Nenhum dos procedimentos oferece risco a sua dignidade ou saúde, isto é, não envolve riscos diretos ao Sr (a). Os resultados deste estudo serão utilizados e divulgados em eventos científicos, nos quais os pesquisadores se comprometem a divulgar os resultados obtidos.

Pesquisador responsável: Emerson Carraro

Email: emersoncarraro@bol.com.br

Fone: 36298137 horário: 8:00 às 11:00 e das 13:30 às 17:30.

Eu _____ declaro que estou dispondo-me a esta pesquisa, li o termo acima e entendi o objetivo do estudo do qual fui convidado a participa. Entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que este afete meu trabalho e autorizo voluntariamente a utilização do material clínico do meu dependente _____ nas atividades da pesquisa.

Assinatura do pesquisador

Assinatura do responsável

Guarapuava, _____ de _____ de 201__