

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Imunologia/Doenças Infecto-Parasitárias

Vívian Honorato Barletta

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE NOROVÍRUS
ASSOCIADOS A CASOS DE DOENÇA DIARRÉICA AGUDA
INFANTIL**

JUIZ DE FORA

2011

VIVIAN HONORATO BARLETTA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE NOROVÍRUS
ASSOCIADOS A CASOS DE DOENÇA DIARRÉICA AGUDA
INFANTIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas na área de
Imunologia e Doenças Infecto-
Parasitárias.

Orientadora

Dra. Profa. Maria Luzia da Rosa e Silva

Co-orientadora

Profa. Dra. Iná Pires de Carvalho

JUIZ DE FORA

2011

Barletta , Vívian Honorato.

Detecção e caracterização molecular de norovírus associados a casos de doença diarréica aguda infantil / Vívian Honorato Barletta. – 2011.
122 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Imunologia)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Diarreia. 2. Criança. 3. Norovirus. I. Título.

CDU 616.935-053.2

DESENVOLVIMENTO

Laboratório de Virologia

Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz/RJ

COLABORAÇÃO

Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Dra. Marize Pereira Miagostovich

Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz –
Fundação Oswaldo Cruz/RJ

APOIO FINANCEIRO

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

VIVIAN HONORATO BARLETTA

Detecção e caracterização molecular de norovírus associados

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Aprovada em: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Luzia da Rosa e Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Cerrato Tibiriçá
Universidade Federal de Juiz de Fora

A Deus e a meus pais, Carmem e Anderson. Pelo amor, pelas oportunidades que me propiciaram, pelo apoio constante e, principalmente, pelo exemplo de dedicação e determinação para o alcance dos meus ideais. Minha admiração e eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela direção, pelo sustento, pela família, pelos amigos e por todas as vitórias alcançadas.

À minha família, em especial aos meus pais, responsáveis por todas as minhas conquistas, e que muitas vezes, abdicaram dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Agradeço a vocês por mais esta vitória, sobretudo, por terem sempre acreditado em mim, valorizando o estudo como parte essencial para meu crescimento. Meus pais foram e continuam sendo grandes incentivadores da minha formação profissional. A alegria e satisfação de vocês me mantém vivo, o amor de vocês me sustenta. Minha grande admiração e eterna gratidão!!!

Às minhas irmãs, Carolina e Raphaela, pelo grande amor e amparo nos momentos mais difíceis. Suas palavras de carinho me sustentaram.

À grande amiga Vanessa, pelo carinho, compreensão e incentivo, transmitidos em todos os momentos. Pelo grande amparo e acolhimento nos momentos mais difíceis.

Às amigas, Patrícia e Thaís, pelo grande carinho e incentivo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luzia da Rosa e Silva, meus sinceros agradecimentos, pela oportunidade concedida, pela orientação competente, confiança, ensinamentos valiosos, paciência e busca da perfeição. Pela grande amizade que sempre me incentivou a crescer. Muito obrigada por tornar realidade mais este grande sonho.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Iná Pires de Carvalho, grande incentivadora do meu crescimento pessoal e profissional. Pela grande dedicação, pela sua paciência em ensinar. Sua exigência, sabedoria e competência foram essenciais para a realização de mais este trabalho.

À Dra. Sandra Tibiriçá, pela contribuição fundamental e ensinamentos constantes para a concretização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Betânia Drumond, pela paciência e prestimoso auxílio no trabalho com as sequências. Sua competência e boa vontade foram de grande ajuda na realização desta parte do trabalho.

À Coordenação da Pós-Graduação em Ciências Biológicas e aos professores do programa, pelos valiosos ensinamentos transmitidos.

Aos professores do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo grande companheirismo, pela ajuda incansável e pelas muitas alegrias compartilhadas. Em especial, ao meu amigo Daniel, pelo grande amparo na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ-RJ, especialmente ao Dr José Paulo Gagliardi e à Dra Marize Miagostovich, pela grande colaboração que permitiu a concretização deste trabalho. Agradeço ainda à Mônica Simões Rocha Ferreira e à Maria da Penha Trindade Pinheiro Xavier, pelo apoio e ensinamentos dos primeiros passos na obtenção e edição das sequências.

À FAPEMIG e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro, que tornou possível a concretização dos ensaios e a minha dedicação à realização deste trabalho.

RESUMO

Os norovírus (NoV) são importantes agentes etiológicos, responsáveis por surtos e casos esporádicos de doença diarreica aguda, que acometem indivíduos de todas as idades. A partícula viral não apresenta envelope e o material genético é constituído por uma molécula de RNA de fita simples, de polaridade positiva. Pertencem à família *Caliciviridae*, gênero *Norovirus* e estão classificados em cinco genogrupos (GI–V), sendo que os NoV humanos estão agrupados nos genogrupos I, II e IV e destes, os NoV do genogrupo II e genótipo 4 (GII.4) são os mais comumente encontrados, em todo o mundo. Apesar da associação destes vírus com a doença diarreica aguda estar bem documentada na literatura mundial, no Brasil, os trabalhos são escassos e restritos aos grandes centros e adjacências. Assim, considerando-se o pouco conhecimento sobre os norovírus e a inexistência de dados epidemiológicos na cidade de Juiz de Fora, MG, foi realizado o presente estudo, cujos objetivos foram a detecção e caracterização molecular de amostras de NoV, associadas a casos esporádicos de doença diarreica aguda infantil, bem como a avaliação da influência de fatores climáticos e demográficos na ocorrência destas infecções. De janeiro de 2008 a dezembro de 2009, 218 espécimes fecais foram analisados para a presença de NoV, por RT-PCR convencional, todos obtidos de crianças de 0 a 12 anos de idade, proveniente de atendimentos ambulatoriais (89,45%) e hospitalizados (10,55%). Foram detectadas 20 (9,17%) amostras positivas e observou-se uma tendência de sazonalidade das infecções no período da estação seca, no ano de 2008, fato que não se repetiu em 2009. A maioria das amostras positivas foi detectada em crianças na faixa de 0 a 36 meses e não houve correlação, estatisticamente significativa, entre a ocorrência das infecções e o sexo. Das 20 amostras detectadas, 19 foram caracterizadas como NoV GII e 1 como NoV GI. O sequenciamento parcial do genoma e a análise filogenética das amostras selecionadas, revelou a presença de NoV dos genótipos GII.4 e GII.6, que co-circularam nos dois anos do estudo. As amostras NoV GII.4, detectadas em Juiz de Fora, apresentaram maior similaridade de nucleotídeos e de aminoácidos com aquelas que circularam no estado do Rio de Janeiro nos anos de 2006, 2007 e 2008. A análise filogenética das amostras NoV GII.6 detectadas em Juiz de Fora, associada à alta similaridade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos, mostrou que estas foram mais proximamente relacionadas com a amostra NoV GII.6 (GU132461/2007), detectada no estado do Rio de Janeiro em 2007, fatos que, aliados à proximidade geográfica de ambas as cidades, sugerem uma possível linhagem comum entre as mesmas. Este levantamento epidemiológico permitiu constatar a presença e circulação de NoV na população infantil de Juiz de Fora, MG, demonstrando sua importante participação como agente etiológico das diarreias agudas, também nesta comunidade.

Descritores: Diarreia Infantil, Norovírus, Epidemiologia, Reação em Cadeia da Polimerase Via Transcriptase Reversa, Análise de Sequência com Séries de Oligonucleotídeos.

ABSTRACT

Noroviruses (NoV) are important etiological agents responsible for outbreaks and sporadic cases of acute diarrhea in individuals of all ages. The viral particles are nonenveloped with and the genome is composed of a positive single-stranded RNA. Norovirus belongs to the *Caliciviridae* family, *Norovirus* genus and are classified into five genogroups (GI-V), with GI, GII and GIV being found in human and among them, the NoV GII genotype 4 (GII.4) are the most commonly found worldwide. In Brazil, norovirus surveys are realized mainly in research institutes, carried out in the biggest centers and surroundings. Thus, considering the little knowledge about these viruses and the lack of epidemiological data on this viral infection in the Juiz de Fora city, MG state, it was performed this study, which aimed to detect and characterize the NoV samples, associated with sporadic cases of acute infantile diarrhea, as well as assess the influence of climatic and demographic factors in the occurrence of these infections. Between January 2008 to December 2009, 218 fecal specimens were analyzed for the presence of NoV by conventional RT-PCR, all obtained from children 0-12 years of age, from outpatient (89.45%) and inpatients (10.55%). We detected 20 (9.17%) positive samples and there was a tendency for seasonal infections during the dry season in 2008, a fact which was not repeated in 2009. The biggest number of positive samples were detected in children aged 0 to 24 months and there was no statistically significant correlation between the occurrence of infections and sex. Of the 20 samples detected, 19 were characterized as NoV GII and 1 as NoV GI. The partial genome sequencing and phylogenetic analysis of selected samples revealed the presence of NoV genotypes GII.4 and GII.6, which co-circulated in the two years of study. Samples NoV GII.4 detected in Juiz de Fora, showed greater similarity of nucleotides and aminoacids with those that circulated in the state of Rio de Janeiro during 2006, 2007 and 2008. Phylogenetic analysis of the samples GII.6 NoV, detected in Juiz de Fora, associated with the high similarity of nucleotide and amino acid sequences showed that they were most closely related to the sample GII.6 NoV (GU132461/2007) detected in the state of Rio de Janeiro in 2007. This fact associated with the geographical proximity of both cities, suggesting a possible common lineage between them. This epidemiological survey revealed the presence and circulation of NoV in the infantile population of Juiz de Fora, MG, demonstrating its important role as an etiologic agent of acute diarrhea, also in this community.

Keywords.: Childhood Diarrhea - Norovirus - Epidemiology - Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction - Oligonucleotide Array Sequence Analysis.

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Organização do genoma dos norovírus e mapa de clivagem proteolítica da poliproteína precursora codificada na ORF 1.	25
Figura 2. Organização da estrutura icosaédrica do capsídeo dos norovírus.	26
Figura 3. Representação esquemática do genoma dos norovírus.	34
Figura 4. Mapa representativo da região da zona da Mata Mineira.	45
Figura 5. Fluxograma dos procedimentos para detecção e caracterização molecular dos norovírus.	49
Figura 6. Gel de agarose 1,5%, após separação eletroforética, dos produtos de PCR para detecção dos NoV.	60
Figura 7: Distribuição mensal das amostras testadas e positivas para norovírus, em 2008 (A) e 2009 (B).	62
Figura 8. Distribuição temporal das amostras de norovírus detectadas nos anos de 2008 e 2009.	63
Figura 9. Distribuição mensal das amostras positivas para norovírus e valores médios de temperatura e precipitação no município de Juiz de Fora, em 2008 (A) e 2009 (B).	64
Figura 10. Distribuição etária (em meses) dos norovírus, no ano de 2008 e 2009.	65
Figura 11: Percentual acumulado do grupo etário, em meses, das infecções causadas por NoV dos anos de 2008 e 2009.	66
Figura 12: Gel de agarose 1,5%, após separação eletroforética, dos produtos de PCR para caracterização dos NoV nos genogrupos I e II.	68
Figura 13. Árvore filogenética obtida a partir da análise das sequências de nucleotídeos codificante para a proteína VP1 do capsídeo.	72
Figura 14. Sequências nucleotídicas parciais do gene codificante para a proteína do capsídeo (VP1).	75
Figura 15. Sequências de aminoácidos deduzidas das sequências parciais de nucleotídeos do gene codificante para a proteína do capsídeo (VP1).	77
Figura 16. Sequências nucleotídicas parciais do gene codificante para a proteína do capsídeo (VP1).	79

Figura 17. Sequências de aminoácidos deduzidas das seqüências parciais de nucleotídeos do gene codificante para a proteína do capsídeo (VP1). 80

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Total de amostras positivas e testadas para norovírus nos anos de 2008 e 2009	61
Tabela 2. Distribuição por grupo etário e sexo das amostras testadas para norovírus no ano de 2008 e 2009	67
Tabela 3. Caracterização molecular, quanto ao genogrupo viral, das amostras de norovírus detectadas em 2008 e 2009	69
Tabela 4. Relação das amostras positivas para norovírus, nos anos de 2008 e 2009	70
Tabela 5. Descrição das 11 amostras de norovírus GII sequenciadas	71

LISTA DE QUADROS

	Pag.
Quadro 1. Genogrupos e genótipos dos norovírus.	24
Quadro 2. Oligonucleotídeos usados nas reações de PCR para detecção (a e b) e caracterização (c e d) dos norovírus	48
Quadro 3. Reagentes utilizados na reação da transcrição reversa obtenção do cDNA	52
Quadro 4. Reagentes utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação da região B do norovírus	53
Quadro 5. Reagentes utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase para amplificação da região D do genoma dos norovírus	55
Quadro 6. Reagentes utilizados na reação de sequenciamento	57
Quadro 7. Número de acesso das sequências protótipos de norovírus (NoV) resgatadas do Portal “Entrez Pubmed GenBank” que foram utilizadas neste estudo	58
Quadro 8. Matriz de similaridade obtida a partir do alinhamento das sequências desse estudo com demais sequências depositadas no “Genbank” de outras regiões do país e com o protótipo (“ <i>Bristol virus</i> ”)	74
Quadro 9. Matriz de similaridade obtida a partir do alinhamento das sequências do estudo com demais sequências de outras regiões do país e com o protótipo GII.6	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa: aminoácidos
CDC: Center for Disease Control and Prevention- Centro de Controle e Prevenção de Doenças.
HuCV: calicivírus humanos
cDNA : DNA complementar
CEPH-UFJF: Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Juiz de Fora.
DATASUS: Departamento de Informática do SUS
dNTP: dideoxynucleotídeo trifosfato
DMSO: dimetil sulfoxido
DMPI/ICB-UFJF: Departamento de microbiologia, parasitologia e imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.
EDTA: ácido etilendiamino tetracético
EGPA: Eletroforese em gel de poliacrilamina
EUA: Estados Unidos da América
GII: norovírus genogrupo II
GI: norovírus genogrupo I
HIV: vírus da imunodeficiência humana adquirida
HBGAs: antígenos dos grupos histo-sanguíneos humanos
IFA: Imunofluorescência Direta
IL-2: interleucina 2
IL-6: interleucina 6
IL-10: interleucina 10
IME: Imunomicroscopia Eletrônica
Kb: quilobases
MS: Ministério da Saúde
ME: Microscopia Eletrônica
NoV: Norovírus
NoV GII.4: Norovírus genogrupo II e genótipo 4
NoV GII.6: Norovírus genogrupo II e genótipo 6
NaOH: hidróxido de sódio
VPg: proteína viral associada ao genoma
nt: nucleotídeo
nm: nanômetro
NTPase: nucleosídeo trifosfatase
OMS: Organização Mundial de Saúde
ORF: *Open Reading Frames* – seqüências de leitura abertas
ORS: *Oral Rehydration Solution* – terapia de reidratação oral
qPCR – Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real
q.s.p. – quantidade suficiente para
ppm: parte por milhão
IFN- γ : interferon gama
RV-A: rotavírus grupo A
RIA: radioimunoensaio
RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase Precedida de Transcrição Reversa
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
RpRd: RNA-dependente RNA polimerase

TRO: terapia de reidratação oral
VLPS: partículas vírus-like

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Norovírus.....	21
2.1.1 Histórico.....	21
2.1.2 Classificação, morfologia e estrutura.....	22
2.1.3 Replicação viral.....	26
2.1.4 Patogênese.....	28
2.1.5 Manifestações clínicas.....	29
2.1.6 Imunidade.....	30
2.1.7 Diagnóstico laboratorial.....	32
2.1.8 Epidemiologia.....	35
2.1.9 Tratamento e profilaxia.....	41
2.1.10 Justificativa.....	42
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivos gerais.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 Materiais.....	45
4.1.1 Área estudada.....	45
4.1.2 Amostras fecais.....	46
4.1.3 Amostras controle.....	47

4.1.4 Oligonucleotídeos iniciadores.....	47
4.2 Métodos.....	48
4.2.1 Fluxograma dos procedimentos deste estudo	48
4.2.2 Preparo das suspensões fecais	50
4.2.3 Extração do genoma viral.....	50
4.2.4 Reação de transcrição reversa (RT).....	51
4.2.5 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção do norovírus (PCR-região B).....	52
4.2.6 Determinação dos genogrupos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - região D).....	54
4.2.7 Sequenciamento para identificação do genótipo dos norovírus	56
4.2.8 Análise filogenética das seqüências da região D	57
4.2.9 Análises estatísticas	59
5 RESULTADOS	60
6 DISCUSSÃO.....	81
7 CONCLUSÕES.....	90
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
APÊNDICE.....	112
ANEXO A.....	118
ANEXO B.....	119
ANEXO C.....	120
ANEXO D.....	121

1 INTRODUÇÃO

A diarreia aguda é uma das doenças que mais comumente afeta humanos, sendo definida pela presença de três ou mais episódios de fezes líquidas ou de consistência reduzida, em um período de 24 horas, com duração máxima de 14 dias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Segundo dados globais das causas da mortalidade infantil, no ano de 2008, das 8.795 milhões de mortes em crianças menores de 5 anos de idade no mundo, 68% (5.970 milhões) foram causadas por doenças infecciosas, sendo as porcentagens mais elevadas associadas à pneumonia (18% = 1.575 milhões), à diarreia (15% = 1.336 milhões) e à malária (8% = 0.732 milhões) (BLACK et al., 2010).

O impacto da doença diarréica é maior nos países em desenvolvimento, tendo em vista sua associação com os problemas higiênico-sanitários (mais de um bilhão de pessoas não têm acesso à água potável, e mais de dois bilhões não tem acesso a serviços de saneamento adequado), de má nutrição (cerca de um quarto das crianças são mal nutridas) e sobrecarga dos sistemas públicos de saúde. Neste contexto, em países da África, Ásia e América Latina a diarreia constitui a segunda causa mais comum de mortalidade infantil, sendo responsável por 1 a 3 milhões de óbitos em crianças menores de 5 anos, por ano (BLACK et al., 2010).

A doença diarréica está associada, também, a altas taxas de morbidade infantil, com a ocorrência de quadros clínicos que podem variar de leves, com discretas alterações sistêmicas, até formas graves acompanhadas de desidratação severa e choque hipovolêmico (SANTOSHAM et al., 2010). É uma síndrome frequente na infância, representando uma das principais causas de consulta médica e hospitalização (RIBEIRO et al., 2008; PATEL et al., 2009).

No Brasil, segundo dados do DATASUS relativos ao ano de 2008, a doença diarréica aguda foi responsável por 7,2% das hospitalizações (BRASIL, 2009a) e 2,5% das mortes, em crianças abaixo dos 5 anos (BRASIL, 2009b). Recentemente, um estudo sobre a prevalência da diarreia aguda em crianças hospitalizadas durante os anos de 2005 a 2008, realizado em Juiz de Fora,

apontou que esta doença foi a terceira causa de hospitalização infantil e também uma importante causa de morbidade infantil no município (ROCHA, 2010). No entanto, esses dados devem ser analisados com cautela, tendo em vista que a doença diarréica não está incluída no conjunto de doenças nacionais de notificação compulsória, o que pode contribuir para um número expressivo de casos não diagnosticados dessa doença, no Brasil (FAÇANHA et al., 2005).

A doença pode ser causada por diversos agentes infecciosos que aderem ou invadem a mucosa intestinal, assim como pelas enterotoxinas produzidas pelos mesmos (WILHELMI et al., 2003). Dentre estes agentes estão os vírus, as bactérias e os parasitos.

A importância das infecções intestinais bacterianas e parasitárias está diretamente relacionada às condições sócio-econômicas da população, entretanto, o mesmo não pode ser afirmado para os vírus, visto que muitos deles permanecem como problema de saúde pública, mesmo em países desenvolvidos, nos quais a população desfruta de boas condições sócio-econômicas (PATEL et al., 2008). Nestes países, os vírus são a principal causa de diarreia aguda, chegando a ser responsáveis por até 80% das doenças causadas por ingestão de alimentos contaminados (TUAN et al., 2010).

Atualmente, os agentes virais, comprovadamente, associados à doença diarréica são: rotavírus (*Rotaviridae*), saporovírus e norovírus (*Caliciviridae*), adenovírus entéricos (*Adenoviridae*), astrovírus (*Astroviridae*), bocavírus (*Parvoviridae*), aichi virus (*Picornaviridae*), torovírus e coronavírus (*Coronaviridae*), (WILHELMI et al., 2003; PATEL et al., 2009; PHAM et al., 2010).

Os rotavírus tem sido reconhecidos como um dos principais responsáveis, em todo o mundo, pela doença diarréica aguda que acomete crianças de até 5 anos de idade (PARASHAR et al., 2006; TODD et al., 2010). Segundo levantamentos epidemiológicos realizados em diferentes países, a prevalência de rotavírus nas diarreias agudas varia de 12% e 71%, com média de 34% em crianças menores de três anos de idade (ANDREASI et al., 2007; TODD et al., 2010). No entanto, estudos recentes revelaram uma crescente participação dos norovírus na gênese da doença diarréica aguda, sobretudo, nos países em desenvolvimento, onde estes vírus foram responsáveis por mais de 1,1 milhões de hospitalizações e

cerca de 218.000 mortes, por ano, de crianças menores de 5 anos de idade (PATEL et al., 2008; KHAN et al., 2010).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NOROVÍRUS

2.1.1 HISTÓRICO

A primeira descrição de doença diarréica aguda, possivelmente associada a vírus, foi publicada por Zahorsky et al. (1929), que a denominou “doença do vômito do inverno”. Porém, muitos anos se passaram até que o agente etiológico pudesse ser corretamente relacionado com a doença, que ocorria no hemisfério norte nas estações outono-inverno, e cujas manifestações clínicas eram diarreia, náuseas, vômitos e febre branda.

Experimentos realizados com voluntários, que ingeriram filtrados de amostras fecais, isentos de bactérias, provenientes de surtos diarréicos ocorridos nos EUA, de 1946 a 1947, demonstraram a reprodução da doença diarréica, reiterando observações anteriores da participação de outros agentes não bacterianos, nessas síndromes (GORDON et al.,1947). No entanto, durante vários anos, foi difícil estabelecer a relação entre os vírus encontrados nas fezes com os casos de diarreia aguda, tendo em vista o pouco desenvolvimento das técnicas necessárias para o isolamento, detecção e caracterização dos mesmos (GORDON et al.,1947; HIGGINS et al., 1956).

Em 1968, um surto de gastroenterite aguda acometeu estudantes e professoras de uma escola primária na cidade de Norwalk, Ohio, EUA, durante o inverno. A doença foi caracterizada por diarreia, náuseas, vômitos e dor abdominal. Os sintomas persistiram por 12 a 24 horas e nenhum paciente foi hospitalizado. Casos em contactantes também foram observados. Este surto ficou conhecido como surto de Norwalk e casos com características epidemiológicas semelhantes foram também descritos em outras regiões de

Ohio e em estudantes na Flórida, EUA (ADLER & ZICKL, 1969). Estudos realizados nos EUA, a partir de então, contribuíram para um grande avanço na elucidação do papel dos vírus como agentes etiológicos das diarreias.

Dolin et al. (1971) realizaram estudos envolvendo os surtos de diarreia observados em diferentes regiões no EUA, incluindo o surto de Norwalk e por experimentos com voluntários, confirmaram as observações prévias de que a gastroenterite infecciosa não-bacteriana poderia ser induzida, experimentalmente, por administração oral de filtrados obtidos a partir de fezes de pessoas doentes (DOLIN et al., 1971).

Posteriormente, foram realizados estudos laboratoriais de imunomicroscopia eletrônica a partir dos filtrados fecais derivados do surto de Norwalk, a fim de se identificar o agente etiológico. Assim, a presença de partículas virais de 27nm, encontradas nestes filtrados, aliada a constatação de anticorpos específicos em indivíduos submetidos, tanto a infecções naturais, quanto nas experimentais, levaram à conclusão que os vírus Norwalk eram o agente etiológico do surto de Ohio. Estes fatos apontaram para o primeiro vírus reconhecido como causador de gastroenterite aguda, no homem (KAPIKIAN et al., 1972; 1973).

2.1.2 CLASSIFICAÇÃO, MORFOLOGIA E ESTRUTURA

Durante as décadas de 1970 e 1980, a microscopia eletrônica (ME) foi a técnica mais utilizada para investigação de espécimes fecais, oriundos de casos de gastroenterite aguda, com inúmeros relatos da presença de pequenos vírus não-cultiváveis. Inicialmente, a semelhança morfológica das partículas com outros vírus da família *Picornaviridae* fez com que estes agentes fossem classificados dentro desta família. Entretanto, observações posteriores da existência de uma proteína estrutural predominante e da

presença de depressões em forma de cálice na superfície das partículas, alteraram a classificação destes vírus para a família *Caliciviridae*, modificação esta ratificada em 1990, a partir da clonagem e caracterização do genoma do *Norwalk virus* (MADELEY & COSGROVE, 1976; GREENBERG et al., 1981; XI et al., 1990; ICTV, 2009).

Atualmente a família *Caliciviridae* é dividida em cinco gêneros: *Norovirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus*, *Nebovirus* e *Vesivirus*. Os vírus do gênero *Norovirus* - cujo protótipo é a espécie *Norwalk vírus*- e *Sapovirus* infectam principalmente seres humanos, enquanto os demais infectam animais como bovinos, coelhos, felinos e suínos (ICTV, 2009).

Alguns esquemas de classificação baseados no genoma destes vírus já foram propostos. Com o intuito de estabelecer critérios mais precisos, para a classificação dos norovírus, foi realizado um estudo no qual foram analisadas 164 sequências completas da proteína VP1, incluindo todas as sequências dos cinco genogrupos, disponíveis nesta ocasião. De acordo com o percentual de similaridade dos aa, foram propostos três níveis de classificação: Genogrupo (44,9% – 61,4%), Genótipo (14,3% – 43,8% e Estirpe (0% – 14,1%). Deste modo, a análise de sequências completas do gene que codifica a proteína VP1 (ORF2) classifica os norovírus em cinco genogrupos (GI-GV, dos quais GI, GII e GIV foram encontrados em humanos, GIII em bovinos e GV em murinos) e 29 genótipos (quadro 1). Assim, cada genogrupo é formado por genótipos e cada genótipo é formado por estirpes com elevada similaridade entre suas sequências, ou seja, os genótipos são constituídos por amostras que apresentam elevada similaridade de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) (ZHENG et al., 2006).

Quadro 1: Genogrupos e genótipos dos norovírus.

Genogrupo	Hospedeiro	No. de sequências analisadas	No. de Genótipos
GI	Humano	30	8
GII	Humano/Suíno	121	17
GIII	Bovino	9	2
GIV	Humano	3	1
GV	Murino	1	1
Total		164	29

Adaptado de Zheng et al., 2006.

Os norovírus são partículas que apresentam 26 a 37 nm de diâmetro, capsídeo icosaédrico e não contém envelope (BULL et al., 2005). O genoma é constituído de uma molécula de RNA de fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 7,6Kb, o qual está covalentemente ligado, na extremidade 5', com uma proteína designada VPg, componente presente no vírion, em menor quantidade (GREEN et al., 2007).

O genoma é organizado em três fases abertas de leitura – ORFs - (*Open Reading Frames*): ORF1, ORF2 e ORF3 (figura 1). Possui também uma região não traduzida, tanto na extremidade 3', quanto na extremidade 5' e uma cauda poli (A) na extremidade 3' (GREEN et al., 2007).

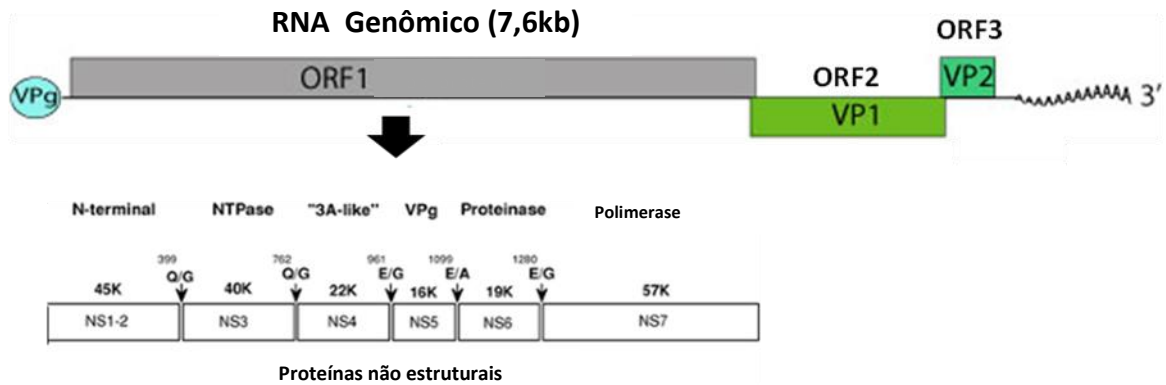


Figura 1: Organização do genoma dos norovírus e mapa de clivagem proteolítica da poliproteína precursora codificada na ORF 1. Adaptado de Green et al., 2007.

A ORF1 codifica uma poliproteína que, após clivagem proteolítica, gera as proteínas não-estruturais designadas NS1-2, NS3, NS4, NS5, NS6 e NS7. A NS1-2 e a NS4 ainda não tem uma função conhecida. A NS3 atua como uma trifosfatase; a NS5, provavelmente, na síntese de novas moléculas de RNA viral, quando dá origem a VPg; a NS6 como uma protease viral e a NS7 como uma RNA polimerase - RNA dependente (RpRd) (GREEN et al., 2007).

A ORF2 codifica a principal proteína do capsídeo, denominada VP1. Esta proteína se dobra em dois domínios principais, denominados S e P. Os 225 aminoácidos da extremidade N-terminal formam o domínio S, que é mais interno e próximo ao genoma, possuindo ainda elementos fundamentais para a formação e manutenção do capsídeo icosaédrico (figura 2). Já o domínio P, mais externo, compreende os demais aminoácidos da extremidade C-terminal e está dividido em dois sub-domínios designados P1 e P2. Ambos interagem aumentando a estabilidade do capsídeo e formando as protusões do vírion. Há ainda uma região hipervariável no sub-domínio P2, a qual exerce um papel importante na diversidade das estirpes, na imunogenicidade e na interação com o receptor celular (CHOI et al., 2008).

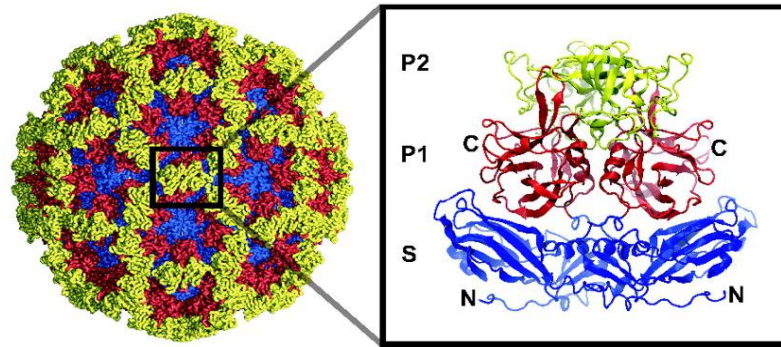


Figura 2: Organização da estrutura icosaédrica do capsídeo dos norovírus. N: extremo N-terminal, C: extremo C-terminal; S: domínio S; P: domínio P; P1 e P2: subdomínios P1 e P2. Adaptado Choi et al., 2008.

A ORF3 codifica uma proteína estrutural menor denominada VP2, a qual parece desempenhar um papel regulatório importante nos eventos de replicação viral, essencial para a síntese de partículas infecciosas. A VP2 atua, ainda, na encapsidação do RNA genômico e na estabilização da VP1, produzindo deste modo, partículas resistentes à degradação proteolítica (HARDY, 2005).

2.1.3 REPLICAÇÃO VIRAL

A estratégia de replicação dos norovírus apresenta características que são compartilhadas por outros vírus de RNA de fita positiva, porém, existem ainda, algumas etapas pouco compreendidas. Os norovírus reconhecem como receptores celulares, os chamados antígenos dos grupos sanguíneos humanos (HBGAs). Estes receptores são carboidratos complexos, compostos por 3 a 8 monossacarídeos ligados a proteínas e lipídeos. São encontrados na superfície de células sanguíneas, células epiteliais das mucosas dos tratos respiratórios, genitourinário e digestivo, ou

ainda, como oligossacarídeos livres, presentes em fluídos biológicos tais como saliva e leite (GREEN et al., 2007; CHOI et al., 2008).

Inicialmente, o vírion se liga, pelos resíduos do subdomínio P2 da proteína VP1, aos receptores celulares HBGAs, na superfície das células epiteliais intestinais. Ocorre a internalização da partícula viral, um processo supostamente dependente de receptor, e subsequentemente, o RNA genômico é liberado dentro do citoplasma celular (descapsidação). A replicação do RNA viral ocorre no citoplasma, assim como para os demais vírus de RNA de fita positiva (GREEN et al., 2007).

O início da tradução ocorre pela interação do genoma viral, ligado à proteína VPg, com a maquinaria de tradução celular. A ORF1 codifica uma grande poliproteína, a qual será processada em proteínas maduras (proteínas não estruturais), pela clivagem por uma protease viral. Com a progressão do ciclo replicativo, ocorre a síntese de uma fita de RNA anti-sense (negativa) a partir do molde do genoma viral, em processo supostamente mediado por interações com proteínas celulares. Essa fita negativa serve como molde para a transcrição de dois outros tipos de fitas positivas, as novas fitas do RNA genômico e do RNA subgenômico. Este último dará origem às proteínas estruturais VP1 e VP2, traduzidas tardiamente e que são essenciais para a montagem das novas partículas virais (GREEN et al., 2007).

A montagem, maturação e liberação das partículas virais são etapas ainda pouco compreendidas e descritas, para os norovírus. A proteína VP2 é mencionada como essencial para a produção de partículas infecciosas e a apoptose, associada a mudanças na estrutura da membrana celular, pode ser um dos mecanismos que favorece a liberação da nova progênie viral (GREEN et al., 2007).

2.1.4 PATOGÊNESE

A falta de um sistema hospedeiro (animais e culturas celulares) apropriados para o cultivo dos norovírus humanos dificultou a compreensão da patogênese destas infecções. Sendo assim, o que se conhece sobre o assunto é proveniente de estudos com voluntários humanos e com norovírus murinos ou outros calicivírus animais (GUO et al., 200; STRAUB et al., 2007).

Os norovírus são estáveis em ambientes ácidos, atravessam o estômago e atingem o intestino delgado. O sítio primário de replicação dos norovírus no organismo humano parece ser a porção jejunal do intestino delgado (DOLIN et al.1971; AGUS et al., 1973).

Em biópsias de voluntários, obtidas durante a fase aguda da doença, foram observadas anormalidades na mucosa intestinal dos pacientes, principalmente, desorganização das células epiteliais e achatamento das vilosidades intestinais. Observou-se, também, uma dilatação do retículo endoplasmático liso e rugoso, com concomitante aumento do número de corpos multivesiculados e redução significativa da atividade enzimática intestinal, durante a doença, o que é coerente com as lesões histológicas descritas. Duas semanas após a inoculação, novas biópsias foram feitas e revelaram que a mucosa de todos os pacientes e a atividade enzimática haviam voltado ao estado mais ou menos normal (DOLIN et al.1971; AGUS et al., 1973). Desse modo, as alterações histopatológicas na mucosa intestinal dos infectados, tais como alargamento e achatamento de vilosidades, vacuolização citoplasmática e alterações transitórias na produção de enzimas digestivas, envolvidas no metabolismo de gorduras e açúcares, são supostamente os mecanismos que acarretam prejuízos na função absorviva de água e eletrólitos, induzindo, por conseguinte, o quadro de diarreia (LOPMAN et al., 2002). Em outros estudos, ainda com voluntários, verificou-se que o período de incubação é curto, com variação de 10 a 51 horas. No entanto, em surtos de diarreia aguda pode ser de 24 a 48 horas, (DOLIN et al.1971; GREEN et al., 2007).

Os norovírus são excretados do hospedeiro infectado pelas fezes. No entanto, com a utilização de técnicas de Imunomicroscopia eletrônica (IME) e Reação em Cadeia da Polimerase Precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR), sua presença também foi detectada em vômitos (O'NEILL et al., 2001).

O período de infecciosidade viral ainda não está bem definido. Estudos clínicos reportaram que a excreção começa cerca de 15hs após a administração oral, com pico de excreção máxima em 25 a 72hs. Entretanto, a presença dos norovírus já foi demonstrada em amostras fecais de 10 dias (HOHNE et al., 2004), 12 dias (O'NEILL et al., 2001), 22 dias (ROCKX et al., 2002) e 47 dias (MURATA et al., 2007), após o desaparecimento dos sintomas. Além disso, em pacientes imunocomprometidos observou-se uma excreção prolongada do vírus, por mais de 120 dias (KAUFMAN et al., 2003). A carga viral excretada varia de 10^7 a 10^8 partículas/g de fezes, sendo a dose infectante menor que 100 partículas virais (GREEN et al., 2007).

2.1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A sintomatologia da doença diarréica aguda provocada pelos norovírus é caracterizada, sobretudo, pela presença de náuseas, vômitos e diarreia acompanhada ou não de dor abdominal, cefaléia e febre. Tais manifestações podem surgir de forma abrupta ou gradual e, em geral, persistem de 3 a 5 dias (ROCKX et al., 2002; GREEN et al., 2007).

A infecção é geralmente autolimitada e com maior morbidade quando associada a diversos fatores como: idade do paciente, subnutrição, co-infecções e uso inadequado de antibióticos. Essas condições podem acarretar numa diarreia persistente, que resulta em desidratação grave (SANTOSHAM et al., 2010). Complicações clínicas podem ocorrer em crianças e idosos, devido à maior sensibilidade a depleção de volume e, também, em situações de grande estresse ou em imunocomprometidos (MATTNER et al., 2006).

Geralmente, o principal sintoma da doença no adulto é a diarreia, enquanto que nas crianças é o vômito, menos frequente, entre os menores de um ano de idade (ROCKX et al., 2002; ARIAS et al., 2010). Estudos realizados no Brasil, com crianças infectadas pelos norovírus, confirmaram que o vômito é a principal manifestação clínica, seguido da diarreia, com presença de febre e muco nas fezes (RIBEIRO et al., 2008; FERREIRA et al., 2010).

2.1.6 IMUNIDADE

Os estudos sobre imunidade das infecções causadas pelos calicivírus são divididos em três períodos: (1) o período 1972-1978, caracterizado por estudos com voluntários humanos; (2) o período de 1978-1990, marcado pelo desenvolvimento e implementação de ensaios de fase sólida, com antígenos virais; e (3) o período de 1990 até o presente, que compreende a utilização de técnicas moleculares e o advento da expressão das proteínas do capsídeo viral em vetores, tais como, o baculovírus e o vírus da encefalite equina venezuelana, o que permitiu a produção das chamadas partículas vírus-like (VLPs) (PATEL et al., 2009; DONALSON et., 2010).

A imunidade protetora para a norovirose tem sido um tópico muito debatido, com relatos conflitantes na literatura. Alguns estudos sugerem a existência de uma imunidade de curta duração e genótipo-específica, ao passo que outros reportaram um perfil de imunidade mais duradouro (DOLIN et al. 1971; AGUS et al., 1973; LINDESMITH et al., 2005; DONALSON et., 2010).

Pouco se sabe sobre a resposta imune elicitada pela infecção com norovírus, uma vez que muitos reagentes requeridos para estudar essas importantes questões ainda estão indisponíveis. Assim, as informações que dizem respeito à resposta imune induzida por estas infecções foram obtidas

por experimentos de desafio em voluntários humanos e, também, por estudos dos surtos relatados da doença (AGUS et al., 1973; DONALSON et., 2010).

Os primeiros estudos, envolvendo voluntários humanos adultos, revelaram um alto grau de susceptibilidade, tanto à doença natural, quanto à doença experimentalmente induzida (DOLIN et al.1971; AGUS et al., 1973). Nos estudos, que utilizaram as VLPs na imunização oral dos indivíduos, observou-se que essas partículas elicitaram uma resposta imune mediada por células, incluindo respostas proliferativas vírus-específicas. Ocorreu um aumento significativo na secreção de IFN- γ e interleucina 2 (IL-2), mas não de interleucinas 6 (IL-6) e 10 (IL-10), aumentando também a ativação de macrófagos e a produção de subclasses de IgG, que favorecem a opsonização viral. Isto sugere, portanto, um domínio na produção de citocinas, voltadas para o perfil de resposta Th1. Já com relação à resposta humoral, foi relatado uma produção significativa de IgG sérica, além de uma resposta de mucosa do tipo IgA (TACKET et al., 2003; LINDESMITH et al.,2005).

Seguindo-se ao desafio de voluntários com os norovírus humanos foram observados três tipos de resposta: 1) resistência, apesar dos desafios repetidos; 2) desenvolvimento de uma imunidade protetora; e 3) susceptibilidade, apesar de desafios repetidos. Dois mecanismos de resistência à infecção foram sugeridos: 1) resistência genética, mediada pela inativação do gene FUT 2 (localizado no cromossomo humano 19), que acredita-se ser codificante para a enzima envolvida na produção de carboidratos constituintes dos receptores HBGAs, a α (1,2) fucosiltransferase e 2) imunidade adquirida, caracterizada pela rápida produção de IgA vírus-específica (LINDESMITH et al.,2005).

As VLPs são partículas que apresentam propriedades morfológicas e antigênicas, similares às partículas selvagens de norovírus, e tem sido muito utilizadas como antígenos para mensurar respostas por anticorpos para as infecções, bem como imunógenos para produzir soro animal hiperimune. (PANTEL et al.,2009; DONALSON et., 2010).

2.1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os norovírus são de difícil cultivo, o que compromete a obtenção de massa viral para a produção de antígenos e anticorpos específicos (JIANG et al., 2000; HOHNE et al., 2004; STRAUB et al., 2007)

Assim, devido à ausência dos métodos sorológicos, durante muitos anos, a presença de norovírus foi avaliada, pelo emprego de outros métodos, tais como: ME, IME e radioimunoensaio (RIA).

A ME é um método clássico para identificar vírus entéricos em amostras fecais, mas é inviável para estudos epidemiológicos e clínicos, tendo em vista os custos com equipamentos e microscopistas qualificados. Além disso, o pequeno número de partículas virais com morfologia característica, presentes nas amostras fecais, dificulta a sua utilização como metodologia de diagnóstico para as infecções pelos norovírus (ATMAR & ESTES, 2001).

A IME, realizada com soros de pacientes convalescentes, foi também uma importante metodologia utilizada. Este ensaio possui maior sensibilidade para detecção viral, quando comparado à ME, mas também tem sua aplicação limitada em estudos epidemiológicos (ATMAR & ESTES, 2001; ROCKX et al., 2002).

O RIA foi desenvolvido como alternativa à IME, para a detecção de antígenos de norovírus nas fezes, tendo sido uma técnica muito utilizada, nos estudos de soroprevalência e na investigação dos surtos de doença diarréica (BLACKLOW et al., 1979).

Os ensaios imunoenzimáticos (EIE) só foram desenvolvidos após o estabelecimento da estratégia de produção das VLPs em células infectadas com baculovírus recombinante, o que tornou possível a produção de soro hiperimune para ser usado em imunoenaios, visando à detecção de antígenos virais (JIANG et al., 1992a; HERRMANN et al., 1995). Atualmente,

existem testes disponíveis, inclusive kits comerciais de EIE, além um teste imunocromatográfico, para o diagnóstico destes vírus, diretamente das fezes (Dako Cytomation, Ely, UK 2001; Denka Seiken, Tokyo, Japan 2002; R-biopharm AG, Germany 2004;2010). Apesar da baixa sensibilidade do EIE, quando comparado a outras técnicas moleculares, este método é aplicável para a triagem nos surtos da doença, principalmente por ser uma técnica rápida, que permite uma análise simultânea de grande número de amostras (HERRMANN et al., 1995; JIANG et al., 2000; CARDOSO & BORGES, 2005; BRUINS et al., 2010). No entanto, para uma análise mais criteriosa, testes mais sensíveis e específicos, como a Reação em Cadeia da Polimerase Precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR) devem ser aplicados nas amostras que apresentaram resultado negativo por EIE (RICHARDS et al, 2003; CARDOSO & BORGES, 2005).

A RT-PCR é considerada, atualmente, o ensaio diagnóstico mais sensível para a detecção dos calicivírus humanos. Apresenta uma sensibilidade de detecção de cerca de 10^2 a 10^3 partículas virais/mL, sendo capaz de detectar o vírus até duas semanas após início da infecção, ou seja, mesmo após a resolução dos sintomas (ATMAR E ESTES, 2001; LOPMAN et al, 2002; MORILLO et al.,2008).

A primeira descrição de RT- PCR para detecção dos norovírus foi realizada no Texas, EUA por Jiang et al. (1992b). Posteriormente, foi observado um grande avanço nos estudos epidemiológicos para identificação dos surtos e casos esporádicos da doença diarreica envolvendo os norovírus. Além disso, foi constatada a enorme diversidade genética destes vírus, o que inviabiliza a utilização das técnicas sorológicas para a sua caracterização, requerendo-se para tal, as técnicas moleculares (ZHENG et al., 2006; PATEL et al.,2009).

O sequenciamento completo do genoma dos calicivírus permitiu desenhar e produzir os iniciadores utilizados nas técnicas de RT-PCR (JIANG et al., 1993; DINGLE et al., 1995; LOPMAN et al., 2002) para a detecção e caracterização dos norovírus, de acordo com sua diversidade genética (FANKHAUSER et al., 2002; VINJÉ, HAMIDJAJA & SOBSEY, 2004). Até o momento não foram descritos iniciadores capazes de detectar todos os

genogrupos de norovírus em uma única reação. Desta forma, diferentes protocolos de RT-PCR tem sido propostos, que utilizam misturas de iniciadores específicos, para os diferentes genogrupos humanos (GI, GII, GIV). Esses iniciadores amplificam diferentes regiões do genoma, como a do gene da RNA polimerase-RNA dependente (ORF1), a da junção da ORF1-ORF2 (região B), que são as mais conservadas, e também, a do domínio amino-terminal, codificante da proteína do capsídeo na ORF2 (região D) (Figura 3) (ANDO et al., 1995; VINJÉ, HAMIDJAJA & SOBSEY, 2004; ZHENG et al., 2006).

Várias pesquisas demonstraram que os iniciadores desenhados para a região D do genoma viral funcionam bem para a caracterização dos norovírus nos genogrupos I e II (figura 3) (VINJÉ, HAMIDJAJA & SOBSEY, 2004; ZHENG et al., 2006).

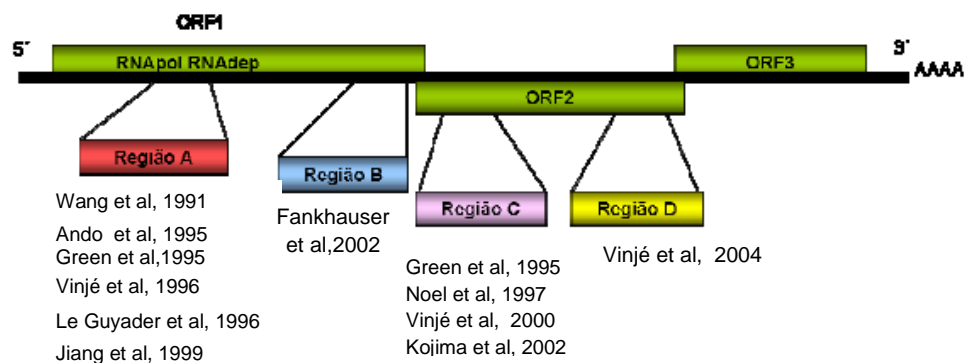


Figura 3: Representação esquemática do genoma dos norovírus mostrando as regiões alvo amplificadas pelas diferentes RT-PCR. Adaptado de Vinjé, Hamidjaja & Sobsey, 2004.

A introdução da Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (qPCR) representou um grande avanço sobre a PCR tradicional, por apresentar maior reprodutibilidade, especificidade e sensibilidade, visto que é capaz de detectar até 10 cópias do transcrito (KAGEYAMA et al., 2003; HOHNE et al., 2004; TRUJILLO et al., 2006). Nessa metodologia, a detecção e quantificação das partículas virais são realizadas em tempo real e com menor risco de contaminação pós-reação, de modo que a etapa mais crítica e

trabalhosa do processo passa a ser a extração do ácido nucléico (SOARES et al., 2007). Estudos comparativos entre as técnicas de qPCR e da PCR convencional já foram realizados e resultados similares para a detecção dos NoV foram relatados (FERREIRA et al., 2008).

2.1.8 EPIDEMIOLOGIA

Os norovírus penetram no organismo humano pela via oral, principalmente, pela ingestão de alimentos e água contaminados. No entanto, a transmissão pode ocorrer, também, pelo contato pessoa-pessoa ou mesmo por aerossóis produzidos durante os vômitos (LOPMAN et al. 2002). Estes vírus resistem a níveis de cloração da água menores que 10 ppm, a ambientes de pH ácido e a variações de temperaturas. Assim, a transmissão dos norovírus pode ser potencializada pela utilização de água contaminada, seja para o consumo, recreação, produção de gelo comercial ou criação de frutos do mar, destinados ao consumo humano, tais como ostras e mexilhões (CDC, 2005).

Estudos de surtos e casos esporádicos de infecção pelos norovírus revelaram taxas de prevalência muito variadas, dependendo do país, da população estudada e também dos métodos de detecção utilizados (PATEL et al., 2009).

A associação dos norovírus como agente etiológico de casos esporádicos de doença diarréica aguda já foi documentada em diversos países. Assim, estudos realizados na Europa, nos EUA e no Canadá revelaram índices de detecção que variaram de 5% a 36% (BON et al., 1999; PANG et al., 1999; DE WIT et al., 2001; OH et al., 2003; ZINTZ et al., 2005; EDGE et al., 2006; AMAR et al., 2007; COLOMBA et al., 2007; FERNÁNDEZ et al., 2010). Pesquisas realizadas em países asiáticos, como Índia, Coreia do Sul, Madagascar, Hong Kong, Tailândia, Vietnã, Malásia e Japão, relataram índices de detecção de 5,4% a 16,7% (LAU et al., 2004; HANSMAN et al., 2004a; 2004b; MONICA et al., 2007; PAPAVENTSIS et al., 2007; KHAMRIN

et al., 2007; YOON et al., 2008; ONISHI et al., 2008), enquanto em países africanos como Egito, Tunísia, Gana, Botswana, Tanzânia e África do Sul as taxas de detecção variaram de 2,5% a 26% (WOLFAARDT et al., 1997; MOYO et al., 2007; SILVA et al., 2008; KAMEL et al., 2009; SDIRI-LOULIZI et al., 2009; MATTISON et al., 2010).

Na América Latina, estudos epidemiológicos envolvendo a investigação de casos esporádicos de doença diarreica, associados aos norovírus, ainda são escassos e representados, principalmente, por pesquisas realizadas no Brasil, Argentina, Peru, Venezuela e Chile, cujos índices de detecção variaram de 5,5% a 39,7% (O'RYAN et al., 2000; BERECIARTU, BOK & GÓMEZ, 2002; PARASHAR et al., 2004; RODRÍGUEZ-GUILLÉN et al., 2005; BORGES et al., 2006; CASTILHO et al., 2006; VICTORIA et al., 2007; NAKAGOMI et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008; FERREIRA et al., 2010).

Em relação à população pediátrica, os norovírus tem sido descritos como causa de, aproximadamente, 12% (intervalo de 4,4 - 30,7%) dos casos esporádicos de doença diarreica severa, que acomete crianças hospitalizadas, menores de 5 anos de idade, em todo mundo (PATEL et al., 2008; KHAN & BASS et al., 2010).

Existem poucos estudos das infecções por norovírus associadas a pacientes imunocomprometidos. Nestes, a doença se manifesta com o sintoma de diarreia aguda e/ou crônica, apresentando, caracteristicamente, um grau mais elevado de gravidade e período prolongado de excreção do vírus (KAUFMAN et al., 2003; MATTFNER et al., 2006). Na Venezuela, em estudo envolvendo adultos e crianças HIV positivos, com e sem sintomas de doença diarreica, evidenciou-se o envolvimento de calicivírus em 12% dos adultos e em 51% das crianças analisadas, revelando assim a importância destes vírus, também como patógenos oportunistas (RODRÍGUEZ-GUILLÉN et al., 2005).

Desde a aplicação dos métodos moleculares, os norovírus têm sido bem documentados como os principais agentes etiológicos causadores de surtos epidêmicos de doença diarreica não-bacteriana, em indivíduos de todas as idades, no mundo todo (FANKHAUSER et al., 2002; CDC, 2005; TUAN et al., 2010). Tais surtos acometem, principalmente, pessoas institucionalizadas, tais como indivíduos em acampamentos, áreas reacionais,

escolas, creches, asilos, cruzeiros marítimos, restaurantes, áreas militares e pacientes hospitalizados (FANKHAUSER et al., 2002; CDC, 2005).

Atualmente, os norovírus são considerados responsáveis por, aproximadamente, 50% de todas as epidemias de gastroenterites ocorridas no mundo todo (PANTEL et al., 2009; KOOPMANS, 2009; TUAN et al., 2010) o que propicia ao desenvolvimento de pesquisas mais direcionadas aos surtos da doença.

Os norovírus possuem alto potencial de infecciosidade, o que associado a confluência de fatores, tais como: o elevado número de infecções assintomáticas, o prolongado período de excreção após o término dos sintomas, a elevada resistência dos vírus fora do hospedeiro e imunidade de curta duração, contribuem para o caráter explosivo dos surtos de origem alimentar (PATEL et al., 2009).

Na epidemiologia das infecções por norovírus, o papel dos alimentos na transmissão do vírus tem sido demonstrado pelo aumento do número de surtos associados ao consumo de alimentos contaminados, principalmente, os alimentos frescos e os frutos do mar (FANKHAUSER et al., 2002; CDC, 2005; TUAN et al., 2010). Nos Estados Unidos, onde há um sistema eficiente de vigilância dos surtos de doença diarreica, conduzidos pelo CDC, estima-se que 40% dos 23 milhões de casos já relatados, estejam associados à ingestão de alimentos contaminados com norovírus. Dados de surtos de doença diarreica de origem alimentar com fonte conhecida de contaminação, ocorridos nos EUA durante os anos de 1990 a 2005, indicaram que estes vírus foram a causa mais comum de surtos associados a produtos frescos, como saladas e vegetais frescos (CDC, 2005; DEWAAL et al., 2007).

Em setembro de 2005, após o desastre do furacão Katrina, que atingiu o estado do Texas, mais de 24 mil pessoas tiveram diarreia causada por água e alimentos contaminados. Dentre todos os casos ocorridos, 18% foram causados por vírus, sendo que o norovírus foi o agente etiológico responsável, em cerca de 50% deles (CDC, 2005).

O expressivo envolvimento destes vírus na etiologia dos surtos de doença diarreica foi confirmado por relatos em diferentes países, tais como Japão, China, países da Europa, Canadá, países do continente asiático, do continente americano e também da África (FANKHAUSER et al., 2002;

LOPMAN et al., 2004; ROCKX et al., 2002; TAYEB et al., 2008; ONISHI et al., 2008; GUO et al., 2009; KAMEL et al., 2009).

Na América Latina, estudos realizados na Argentina, apontaram os norovírus como responsáveis por oito surtos ocorridos em 2004 e sete surtos ocorridos entre 2005 e 2006. Estes estudos evidenciaram a circulação de amostras dos genogrupos GI, GII e GIV e mais especificamente, pertencentes aos genótipos GI.1, GII.4, GII.17 e GIV.1 (GOMES et al., 2007; 2008).

Apesar da co-circulação de genogrupos ser um evento comum, como evidenciado em trabalhos realizados em vários países do mundo, as amostras GII são predominantes, sendo a maioria das estirpes analisadas, do tipo GII.4 (PANTEL et al., 2009; ARIAS et al., 2010). Estes dados reforçam estudos anteriores que mostraram que a prevalência de anticorpos anti-GII é maior que a de anticorpos anti-GI (NOEL et al., 1997; LOPMAN et al., 2004).

No Chile foram detectados anticorpos anti-NoV em até 91% das crianças e adultos analisados (O'RYAN et al., 1998;1999). Um estudo de soroprevalência realizado na Venezuela relatou taxas de anticorpos anti-Nov em 47% a 53% da população urbana de Caracas, capital do país; de 83% na população rural e de 73% a 93% na população indígena (PUJOL et al., 1998).

Estudos soroepidemiológicos realizados no Brasil demonstraram a ampla circulação dos norovírus em diferentes populações. Numa pesquisa realizada com crianças menores de 4 anos, de comunidades carentes do estado do Ceará, a prevalência de anticorpos anti-NoV foi de 71%, enquanto que em outra pesquisa, realizada em oito comunidades indígenas da Amazônia, a presença de anticorpos anti-Nov foi detectada em mais de 90%, em 5 destas comunidades (TALAL et al., 2000; GABBAY et al., 1994).

No Brasil, a investigação dos norovírus associados à doença diarréica aguda tem se concentrado, principalmente, nos grandes centros urbanos, como Rio de Janeiro, São Paulo, Brasília, Goiânia, Bélem, Fortaleza, Recife, Salvador, Vitória e Porto Alegre (CASTILHO et al., 2006; VICTORIA et al., 2007; CAMPOS et al., 2008; FERREIRA et al., 2008; NAKAGOMI et al., 2008; BARREIRA et al., 2010; GEORDIADIS et al., 2010). Um dos primeiros estudos que relatou a ocorrência de calicivírus em casos de diarreia aguda, foi realizado por Timenetsky et al. (1993), que analisaram amostras fecais provenientes de 193 crianças menores de 5 anos, atendidas no Hospital das

Clínicas, em São Paulo, com ou sem sintomas de doença diarréica, tendo sido detectado 1% de casos positivos.

Um dos primeiros surtos relatados ocorreu em 1995, em São Paulo, e acometeu, aproximadamente, 3500 pessoas (CVE/SES-SP, 1995). As amostras fecais destes pacientes foram analisadas por IME, e foram detectadas partículas virais, com morfologia de SRSV (*Small Round Virus Particles*), identificadas como *Norwalk virus* (TANAKA et al., 1996). Posteriormente, a análise destas amostras, por PCR e sequenciamento, permitiu a caracterização das mesmas como norovírus do genogrupo II (TIMENETSKY et al., 1996).

Parks et al. (1999) foram os primeiros a evidenciar a diversidade antigênica e genética dos norovírus, no Brasil. Neste estudo, os norovírus foram detectados em 7% dos casos analisados, envolvendo crianças com e sem diarreia e crianças hospitalizadas com diarreia persistente. O sequenciamento das amostras positivas, detectadas por RT-PCR, identificou a circulação de 8 genótipos: 5 pertencentes ao genogrupo I e 3 pertencentes ao genogrupo II. Essa diversidade de amostras, circulando em indivíduos da mesma comunidade, indicou a existência de múltiplos focos de infecção.

O primeiro relato de norovírus, associado a surto de diarreia em creche, no Brasil, foi descrito por Gallimore et al. (2004), quando estes vírus foram detectados em três dos quatro surtos ocorridos em uma creche na cidade do Rio de Janeiro. Somente amostras GII foram detectadas, com prevalência variando de 23% a 67%. No primeiro e no segundo surto, a maioria das amostras positivas foi caracterizada como GII/4, enquanto que no terceiro, a maioria das amostras pertencia ao genótipo GII/3.

Estudos realizados em diferentes regiões do país, entre os anos de 1995 a 2010, revelaram o envolvimento dos norovírus em surtos e casos esporádicos da doença, acometendo crianças e adultos, hospitalizados ou não. Tais estudos revelaram a co-circulação de norovírus GI e GII, uma grande diversidade de genótipos, a co-infecção de indivíduos com diferentes estirpes e, ainda, a ocorrência de infecções mistas com rotavírus (CASTILHO et al., 2006; SOARES et al., 2007; VICTORIA et al., 2007; CAMPOS et al., 2008; FERREIRA et al., 2008; NAKAGOMI et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008; BARREIRA et al., 2010; GEORDIADIS et al., 2010; FERREIRA et al., 2010).

Em relação à sazonalidade destas infecções, os casos esporádicos e os surtos da doença podem ocorrer ao mesmo tempo, tendo sido observados alguns padrões (LOPMAN et al., 2004, PANTEL et al., 2009) que, no entanto, diferem nos hemisférios norte e sul. No hemisfério norte foi relatado que a doença diarréica causada por norovírus é mais comum no inverno e início da primavera (FROGGATT et al., 2004; BON et al., 2005), enquanto que no hemisfério sul, os surtos foram observados mais frequentemente durante a primavera e o verão (PARASHAR et al., 2004; MARSHAL et al., 2003). Entretanto, no Brasil, alguns estudos, sobretudo quando casos esporádicos da doença foram avaliados, não demonstraram um perfil de sazonalidade para estas infecções, as quais ocorreram em diferentes meses do ano (BORGES et al., 2006; SOARES et al., 2007; NAKAGOMI et al., 2008; FERREIRA et al., 2010).

Do ponto de vista ecológico, por serem excretados nas fezes de indivíduos infectados, os norovírus tem grande potencial para contaminação ambiental. Este tipo de investigação tem-se tornado cada vez mais promissora, frente ao desenvolvimento de métodos mais sensíveis, que permitem a detecção viral direta em diferentes matrizes e também, por causa da crescente exigência de controles microbiológicos (FUMIAN et al., 2009). Neste contexto, pesquisas ambientais realizadas no Brasil, já evidenciaram a presença de norovírus humanos em 5,8% das coleções de água analisadas, localizada nos arredores da cidade de Manaus; em 23% das amostras provenientes de esgoto tratado, água do mar e águas superficiais em Florianópolis; em 58% das coleções de água de estações de esgoto tratado no Rio de Janeiro e em 17,6% nas amostras de águas residuais provenientes de duas estações de tratamento de esgoto hospitalar, também localizadas na cidade do Rio de Janeiro (MIAGOSTOVICH et al., 2008; VICTORIA et al., 2010a; VICTORIA et al., 2010b; PRADO et al., 2011).

2.1.9 TRATAMENTO E PROFILAXIA

Não há um antiviral específico, para combater a infecção provocada pelos norovírus. O tratamento consiste, sobretudo, na reposição hidroeletrólítica para amenizar a perda de fluídos e eletrólitos que ocorre, conseqüentemente, aos episódios repetidos de vômitos e diarreia (GREEN et al., 2007; SANTOSHAM et al., 2010).

A reposição hidroeletrólítica, por via oral ou intravenosa, depende da severidade da desidratação e, conseqüentemente, do quadro clínico instalado (PATEL et al., 2009). As soluções orais de reidratação, tanto comerciais quanto caseiras, devem proporcionar uma reposição adequada ao grau da perda ocorrida. Nesse sentido, as soluções comerciais são preferíveis por serem mais padronizadas que as caseiras, sobretudo, se estas últimas não forem preparadas com a utilização da colher medida apropriada (KOSEK et al., 2003). Nos casos em que a desidratação atinge maior gravidade, pode ser ainda necessário associar à solução de reidratação intravenosa, antipiréticos e antiespasmódicos, dependendo do estado clínico do paciente (SANTOSHAM et al., 2010). Ressalta-se, entretanto, que muitos dos casos da doença diarréica aguda causada pelos norovírus é branda, auto-limitada e normalmente se resolve sem maiores complicações (PATEL et al., 2009).

A compreensão dos mecanismos envolvidos na transmissão dos norovírus é de grande importância para a prevenção da doença. As noroviroses apresentam um curto período de incubação e alto poder de transmissão, principalmente devido à persistência das partículas virais no ambiente. Os norovírus podem ser transferidos de indivíduos com mãos contaminadas, para até sete superfícies limpas diferentes, podendo persistir em superfícies inanimadas secas, de 8 horas a sete dias, o que traz implicações diretas na potencialidade de dispersão da infecção e na origem de surtos. O uso isolado de detergente é pouco efetivo na eliminação deste vírus, sendo necessária a utilização de solução de hipoclorito a 2% associada

com detergente, para a adequada descontaminação de superfícies (BARKER et al, 2004; BRYCE et al., 2005; D´SOUZA et al, 2006).

Para a prevenção da infecção são necessários: a lavagem efetiva das mãos com água e sabão, consumo de água tratada e filtrada, cuidado na ingestão de alimentos não cozidos e, também, a interrupção da transmissão, quando já existe um foco infeccioso instalado (PATEL et al., 2009).

A vacinação é um instrumento que poderá ser utilizado para reduzir a morbidade e a ocorrência dos surtos agudos de doença diarreica, tão comumente associados a estes vírus, e as VLPs de norovírus, compostas por proteínas do capsídeo viral, são promissoras candidatas. A expressão dessas proteínas de norovírus em plantas como o tabaco, batatas e tomates já foi realizada com sucesso e alguns benefícios potenciais foram apontados utilizando-se dessa estratégia de expressão. Entretanto, mais pesquisas são necessárias para o desenvolvimento de novas e mais eficazes estratégias preventivas e terapêuticas e, até o momento, não existe uma vacina disponível a população, o que será uma importante ferramenta para otimizar as políticas de controle e prevenção da infecção causada por estes vírus (TACKET, 2005; ZHANG et al, 2006).

2.1.10 JUSTIFICATIVA

A doença diarreica aguda impacta a saúde pública de forma globalizada, sobretudo, nos países em desenvolvimento devido à alta mortalidade na população. Nos últimos 50 anos, observou-se uma queda na prevalência anual da mortalidade infantil de 13,6 (1955-1979) para 4,9 (1992-2000), redução esta obtida, principalmente, pelo aumento na utilização da terapia de reidratação oral (TRO), do período de aleitamento materno e das melhorias de saneamento e higiene da população. Ainda assim, na década de 1990, aproximadamente, 2,5 milhões de crianças menores de 5 anos

morreram por complicações em decorrência da doença diarréica. Assim, apesar da redução que vem sendo observada nas últimas quatro décadas, esta doença permanece como um importante agravo, não só pela elevada taxa de morbidade, como também pelo fato de que os episódios recorrentes de diarreia podem repercutir no desenvolvimento e crescimento infantil.

Diferentes vírus estão envolvidos na etiologia da doença diarréica, mas, a recente utilização de ensaios moleculares mostrou que os norovírus estão associados a mais de 90% dos casos de gastroenterites não-bacteriana.

Apesar das pesquisas realizadas em diferentes partes do mundo, inclusive no Brasil, enfatizarem o expressivo papel dos norovírus na gênese da doença diarréica, a escassez de exames diagnósticos, comercialmente acessíveis aos laboratórios clínicos de microbiologia, limita o conhecimento sobre o envolvimento destes vírus nos casos desta doença. Assim, a restrição na disponibilidade de métodos diagnósticos de rotina, rápidos e de baixo custo, contribui para que diversos casos de diarreia aguda permaneçam sem uma definição etiológica e, conseqüentemente, que surtos e casos esporádicos dessa doença causada pelos norovírus não sejam esclarecidos. Além disso, a restrição dos estudos de ocorrência e caracterização dos norovírus, aos laboratórios de pesquisas, subestima a real importância epidemiológica destes vírus no país. Neste contexto, diferentemente do que é observado para os rotavírus, a ocorrência e as características epidemiológicas da norovirose são praticamente desconhecidas pelos profissionais e instituições da saúde no nosso país.

Assim, a investigação sobre os norovírus em Juiz de Fora é um trabalho pioneiro, a partir do qual pretende-se contribuir com dados epidemiológicos sobre esses agentes e a infecção causada por eles. A caracterização molecular das amostras detectadas permitirá conhecer os tipos de norovírus circulantes na população estudada, agregando conhecimento aos dados já obtidos por estudos, realizados em outras regiões do país, os quais poderão ser utilizados pelas autoridades de saúde, para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle da doença diarréica aguda.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a prevalência da norovirose e a influência de fatores climáticos e demográficos sobre a ocorrência da infecção, bem como realizar a caracterização molecular das amostras de norovírus detectadas em Juiz de Fora, Minas Gerais, no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2009.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar, através da RT-PCR, a presença de norovírus nos espécimes fecais obtidos de crianças apresentando diarreia aguda.

- Determinar a distribuição mensal dos casos positivos, ao longo do período estudado e avaliar a possível influência de fatores climáticos e demográficos na ocorrência dos mesmos.

- Realizar a caracterização molecular das amostras de norovírus detectadas, para a determinação de seus genogrupos pela reação de PCR e de genótipos, a partir do sequenciamento parcial do genoma.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 ÁREA ESTUDADA

Este trabalho foi realizado em Juiz de Fora, cidade situada na Zona da Mata do estado de Minas Gerais, região Sudeste do país, que apresenta uma área territorial de 1.435,66Km² e tem 517.872 habitantes (figura 4). Segundo fontes oficiais, 98,9% da população é servida de água potável e 97,7% do esgoto recebe tratamento antes de ser dispensado (IBGE, 2010).



Figura 4: Mapa representativo da região da zona da Mata Mineira. Fonte: <http://www.minasgerais.net/diretorio/catimanges/mapa-zonadamata.gif>.

O município possui o clima tropical de altitude, que caracteriza-se por apresentar dois períodos bem definidos: o da estação úmida que vai dos meses de outubro a abril, com temperaturas mais elevadas e maiores precipitações pluviométricas e o da estação seca, que abrange os meses de maio a setembro, período de temperaturas mais baixas e com os menores índices pluviométricos (Secretaria de Política Urbana da PUF/Laboratório de Climatologia Geográfica e Análise Ambiental /UFJF/2009).

4.1.2 AMOSTRAS FECAIS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEPH-UFJF), sob os pareceres de N° 281/2006 e 049/2007 (anexos A, B, C e D).

As amostras fecais, obtidas após assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) pelos responsáveis dos menores, foram enviadas, em ambiente refrigerado, ao Laboratório de Virologia do DPMI /ICB-UFJF, onde receberam codificação e foram registradas de acordo com a coleta, idade e sexo e procedência. Todas as amostras foram estocadas sob refrigeração (-20 °C), até o momento de sua análise.

Para esse estudo transversal o Laboratório de Virologia do DPMI/ICB-UFJF recebeu 218 espécimes fecais, todos provenientes de crianças com até 12 anos de idade, com sintomas de diarreia aguda, que foram atendidas em serviços ambulatoriais de saúde da rede pública e privada do município de Juiz de Fora, no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2009. Todas as amostras foram previamente testadas e negativas para a presença de outros agentes virais (rotavírus, adenovírus entéricos e astrovírus), utilizando-se as metodologias moleculares específicas.

4.1.3 AMOSTRAS CONTROLE

Para a padronização da técnica de RT-PCR e controle positivo dos experimentos realizados foram utilizadas amostras de norovírus, geneticamente caracterizadas e que foram gentilmente cedidas pelo Dr. José Paulo Gagliardi Leite, chefe do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental da FIOCRUZ-RJ. Água livre de Dnase/Rnase (Invitrogen®) foi utilizada como controle negativo.

4.1.4 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Para detecção e caracterização molecular dos norovírus foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores, cujas sequências podem ser consultadas no quadro 2.

Quadro 2: Oligonucleotídeos usados nas reações de PCR para detecção (a e b) e caracterização (c e d) dos norovírus.

Oligonucleotídeos	Sequência (5'→3') ^e	Região no genoma	Amplicon-região alvo	Referência
Mon 431^a(+)	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	5093-5112	213pb (ORF1)	Fankhauser et al., 2002
Mon 432^b(+)	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	5093-5112		
Mon 433^a(-)	GAA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	5285-5305		
Mon 434^b(-)	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	5285-5305		
Cap A^c(-)	GGC WGT TCC CAC AGG CTT	6897-6914	177 pb – (ORF2/CI)	Vinjé, Hamidjaja & Sobsey, 2004
Cap B1^c(+)	TAT GTT GAC CCT GAT AC	6738-6754		
Cap B2^c(+)	TAT GTI GAY CCW GAC AC	6738-6754		
Cap C^d(-)	CTT TYC CAK WTC CCA YGG	6667-6684	253pb- (ORF2/CII)	
Cap D1^d(+)	TGT CTR STC CCC CAG GAA TG	6432-6451		
Cap D3^d(+)	TGY CTY ITI CCH CAR GAA TGG	6432-6452		

a,c = Genogrupo I; b, D = Genogrupo II. e = União Internacional de Bioquímica de Códigos de ambiguidade: I = Inosina; R = Purina (A/G); Y = Pirimidina (C/T); S = forte (C/G), W= (A/T).

4. 2 MÉTODOS

A composição e o modo de preparo das soluções utilizadas durante os experimentos encontram-se disponíveis no apêndice A.

4.2.1 FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS DESTE ESTUDO

A figura 5 apresenta o fluxograma dos procedimentos utilizados na detecção e caracterização molecular das amostras de norovírus.

Os cuidados e precauções requeridos para o trabalho com métodos de amplificação genômica foram estritamente seguidos, sendo cada etapa realizada em áreas distintas.

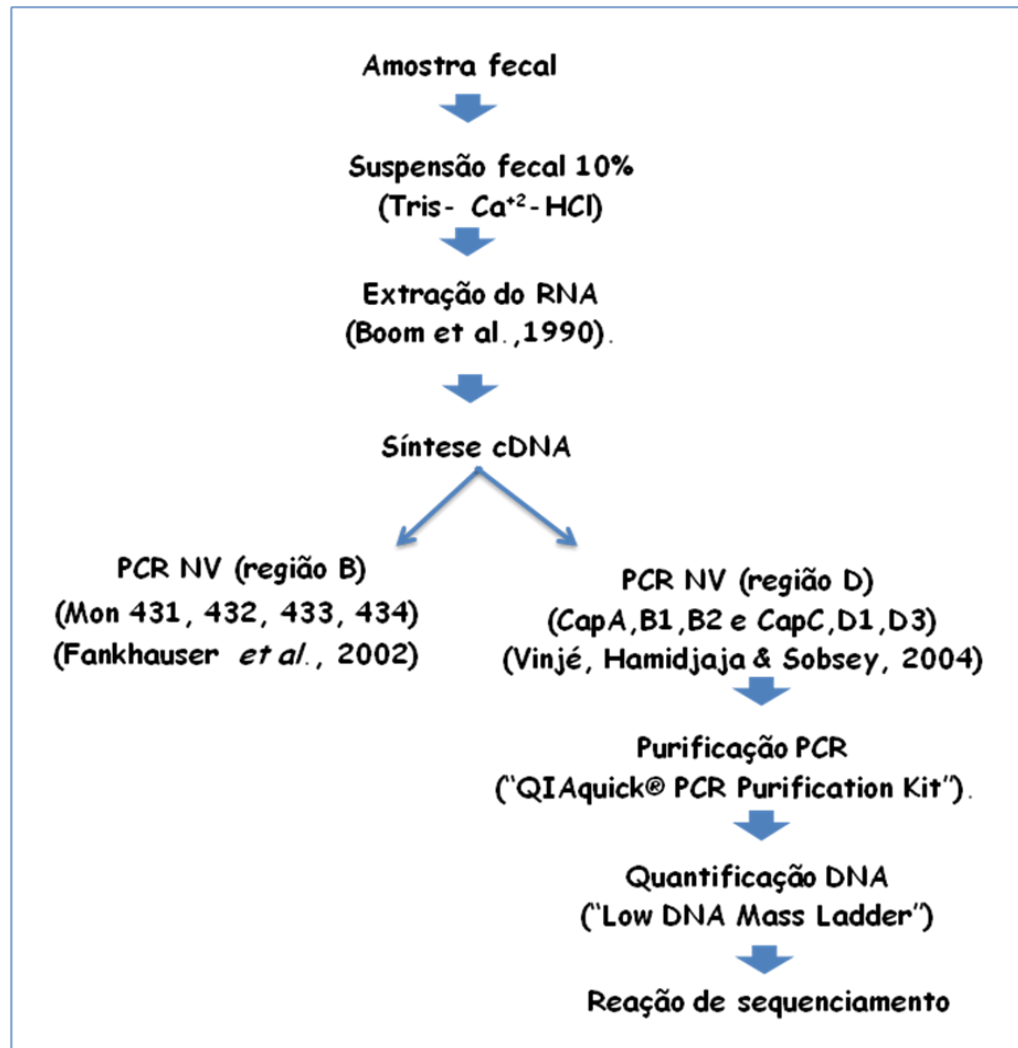


Figura 5: Fluxograma ilustrando os procedimentos para detecção e caracterização molecular dos norovírus a partir das amostras fecais.

4.2.2 PREPARO DAS SUSPENSÕES FECAIS

Suspensões fecais 10%-20%, preparadas em tampão Tris-Ca⁺⁺ 0,01M, pH 7,2, foram homogeneizadas e a seguir clarificadas (3000 x g por 10 minutos, a 4°C). O sobrenadante clarificado foi estocado a -20 °C, até a sua utilização.

4.2.3 EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL

Neste estudo, foi utilizada a técnica de extração de ácido nucléico descrita por Boom et al. (1990), como a descrito a seguir:

Em um microtubo estéril foi adicionado 1000µL de tampão L6 e 400µL do sobrenadante clarificado acima. Após homogeneização por 10 segundos, foi acrescentado ao microtubo 20µL de solução de sílica 12%; após homogeneização por 10 segundos, o microtubo foi colocado em plataforma de agitação lenta, por 30 minutos, e nova centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado em solução de NaOH 10N. Ao precipitado foram adicionados 1000µL de tampão L2 e após homogeneização por 10 segundos, foi realizada outra centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado, em solução de NaOH 10N. No passo seguinte, foram adicionados ao precipitado, 1000 µL de etanol 70% a 4°C, seguindo-se a homogeneização por 10 segundos e centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e, em seguida, adicionados ao precipitado, 1000µL de acetona PA, a 4°C. Após homogeneização por 10 segundos, a suspensão foi centrifugada a 16.000 x g por 1 minuto e o sobrenadante descartado. O microtubo com a tampa aberta foi levado ao banho-maria, à temperatura de 56°C por 15 minutos para a evaporação dos resíduos de acetona. A seguir foram adicionados 60µL de água livre de Rnase/Dnase (Invitrogen®) e feita nova homogeneização por 10

segundos, obtendo-se uma suspensão. O microtubo foi novamente incubado em banho-maria a 56°C por 15 minutos, com a tampa fechada e após este período, foi realizada outra centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto. Cerca de 45µL do sobrenadante, contendo o ácido nucléico viral extraído, foram coletados e transferidos para microtubo limpo e estéril, sendo então estocado a -20 °C, ou mantido a 4 °C, quando usado no mesmo dia.

4.2.4 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

A síntese do cDNA, a partir do RNA viral extraído, foi realizada utilizando-se o iniciador hexâmero randômico pd(N)6 (Amersham Biosciences®, USA). Em microtubo estéril (livre de RNAase e DNase) foram adicionados 5µL do RNA extraído e 1µL de dimetil sulfóxido (DMSO) . Após incubação em termociclador (Techne TC-412 Therna Cyclor, Southam Warwick Shire, UK), a 97°C por 7 minutos, o microtubo foi mantido em banho de gelo. A seguir, foram adicionados 19µL da mistura de reagentes (quadro 3) e a reação de transcrição reversa realizada em termociclador, a 42°C por 1 hora. O produto obtido foi estocado a – 20°C, até o momento de uso.

Quadro 3: Reagentes utilizados na reação da transcrição reversa para a obtenção do cDNA.

Reagentes	Concentração Inicial	Volume/Reação
H ₂ O livre de Dnase/Rnase (Invitrogen®)	-	11,75µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen®)	10X	2,5µL
dntp: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Promega®)	2,5 mM	2µL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50 mM	1,25µL
RT Superscript III™ (Invitrogen®)	200U/µL	0,5µL
pd(N)6 (Amersham Biosciences®)	50 unidades (A260)	1µL

4.2.5 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DO NOROVÍRUS (PCR-REGIÃO B)

O protocolo descrito por Fankhauser et al (2002) foi utilizado como descrito a seguir:

Em um microtubo de 200µL foram adicionados 6µL do cDNA e 19µL da mistura de reagentes (quadro 4), para um volume final de 25µL. Essa mistura foi submetida à desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/30 segundos), pareamento (55°C/1 minuto), extensão (60°C/30 segundos) e um ciclo de extensão final (72°C/7 minutos). Os produtos amplificados foram armazenados a 4°C, até o momento da análise.

Quadro 4: Reagentes utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação da região B do norovírus.

Reagentes	Concentração	Volume/Reação
H ₂ O livre de Dnase/Rnase (Invitrogen®)	-	14,1µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen®)	10X	2,5µL
dntp: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen®)	20µM	2,0µL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50 mM	0,8µL
Taq DNA polimerase platinum (Invitrogen®)	5 U/µL	0,3µL
Mistura de iniciadores (Mon 431 – 432 – 433 – 434)	100µM	0,3µL

Os produtos foram analisados por eletroforese (100 volts por 1 hora e 30 minutos) em gel de agarose a 1,5%, preparado e incorporado com solução de brometo de etídeo 0,5µg/ml (Sigma Chemical Company®), utilizando-se cuba horizontal (HMEDI10-BUV, Biosystems®) com tampão TBE 0,5M 1X, pH 8,4. Foram aplicados em cada poço, 10µL do produto da reação somado a 2µL do corante “blue orange loading dye” (Invitrogen®). Como referência para o tamanho do *amplicon* foi utilizado um padrão de tamanho de DNA de 100pb (Promega®). Após a corrida, os produtos foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (GE HEALTH CARE, United Kingdon) e o registro feito em sistema de captura de imagem (IMAGE QUANT 100- GE HEALTH CARE, United Kingdon), para posterior análise.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram fragmentos amplificados de 213 pares de bases.

4.2.6 DETERMINAÇÃO DOS GENOGUPOS PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR - REGIÃO D)

Após a triagem das amostras positivas, estas foram submetidas à reação de PCR para determinação de seus genogrupos, segundo a metodologia descrita por Vinjé, Hamidjaja e Sobsey (2004). Foram utilizados iniciadores específicos (quadro 2) para amplificação de amostras de norovírus dos genogrupos I e II, os mais comumente encontrados no mundo. Devido à baixa prevalência de amostras do genogrupo IV, estes não foram incluídos nesta pesquisa. Assim, os iniciadores utilizados amplificam um fragmento do genoma, localizado na região D da ORF2 (figura 3), que codifica a proteína VP1 do capsídeo viral, cujos tamanhos esperados são de 177pb para as amostras pertencentes ao genogrupo I e 253pb para amostras pertencentes ao genogrupo II.

Em um microtubo estéril, livre de RNase e DNase, foram adicionados 10µL do cDNA da amostra analisada e 40µL da mistura de reagentes, contendo os iniciadores específicos para o genogrupo I (CAPA,CAPB1 e CAPB2) ou genogrupo II (CAPC,CAPD1 e CAPD3), para um volume final de 50µL (quadro 5).

Quadro 5: Reagentes utilizados na reação de PCR para determinação dos genogrupos.

Reagentes	Concentração inicial	Volume/Reação
H ₂ O livre de Dnase/Rnase (Invitrogen®)	-	26,20 µL
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen®)	10X	5 µL
dntp: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen®)	2,5 mM	4 µL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50 mM	1,5 µL
Taq DNA polimerase platinum (Invitrogen®)	5 U/µL	0,3 µL
Mistura de iniciadores (Cap A, Cap B1, Cap B2, ou Cap C, Cap D1, CapD3)	100µM	3 µL

Devido ao fato da maioria das amostras de norovírus detectados no mundo, pertencerem ao genogrupo II, as amostras analisadas neste estudo foram testadas, primeiramente, para a detecção deste genogrupo. Para tal, os microtubos foram colocados em termociclador e as misturas submetidas à desnaturação inicial à 95°C por 3 minutos e 40 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/1 minuto), pareamento (46°C/1 minuto), extensão (72°C/1 minuto) e um ciclo de extensão final (72°C/10 minutos). As amostras, que na PCR acima, não apresentaram os produtos amplificados específicos, foram testadas com os reagentes para o genogrupo I. Para isso, as misturas foram submetidas à desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e 40 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/1 minuto), pareamento (40°C/1 minuto), extensão (72°C/1 minuto) e um ciclo de extensão final (72°C/10 minutos).

Os produtos foram analisados por eletroforese (100 volts/ 90 minutos) em gel de agarose a 1,5%, adicionado de solução de brometo de etídeo 0,5µg/ml (Sigma Chemical Company®), utilizando-se cuba horizontal (HMEDI10-BUV, Biosystems®) com em tampão TBE 1X 0,5M, pH 8,4. Foram aplicados em cada poço uma mistura de 10µL do produto da reação e 2µL do

corante “blue orange loading dye” (Invitrogen®). Como referência para o tamanho dos produtos foi utilizado um padrão de tamanho de DNA de 100pb (Promega®). Em seguida, os produtos foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (GE HEALTH CARE, United Kingdon) e a imagem registrada em sistema de captura de imagem (IMAGE QUANT 100- GE HEALTH CARE, United Kingdon), para posterior análise.

Nos casos em que não foi possível caracterizar o genogrupo das amostras positivas, pela PCR da região D, após 4 tentativas, foi utilizado, alternativamente, o protocolo de Fankhauser et al. (2002) para detecção de norovírus, que também é descrito como apropriado para definição dos genogrupos das amostras. No entanto, para esta finalidade, os pares de iniciadores Mon foram usados em reações separadas, para a determinação das amostras pertencentes ao genogrupo I (Mon 432,434) e genogrupo II (Mon 431, 433). Em ambos os casos, o tamanho esperado do fragmento amplificado para as amostras positivas foi de 213pb.

4.2.7 SEQUENCIAMENTO PARA IDENTIFICAÇÃO DO GENÓTIPO DOS NOROVÍRUS

Dentre as amostras positivas, caracterizadas quanto ao genogrupo pela PCR da região D (ORF2), algumas representativas do período de estudo, foram aleatoriamente selecionadas, e utilizadas na reação de sequenciamento para determinação do genótipo viral.

Os produtos obtidos pela PCR da região D, das amostras selecionadas, foram purificados, utilizando-se os kits comerciais “QIAquick® PCR Purification Kit” (Qiagen®, Valencia, CA, USA) e “MiniElute PCR Purification Kit” (Qiagen®, Valencia, CA, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Após a purificação, os produtos foram quantificados por comparação com um de padrão de massa “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen®). Uma mistura de 4µL do DNA das amostras purificadas e 4µL de corante “blue orange loading dye” (Invitrogen®) foi aplicada em gel de agarose 2%

(Invitrogen®), incorporado com solução de brometo de etídeo 0,5µg/ml (Sigma Chemical Company®). A corrida eletroforética foi realizada (100 volts/90 minutos), em cuba horizontal (HMEDI10-BUV, Biosystems®) com tampão TBE 1X 0,5M, pH 8,4.

Para o sequenciamento direto dos produtos amplificados e purificados foi utilizado o kit comercial “Big Dye Terminator® v 3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems®, CA, USA), conforme recomendado pelo fabricante (quadro 6), tendo sido utilizados os mesmos iniciadores da reação de amplificação genômica da região D.

Quadro 6: Reagentes utilizados na reação de sequenciamento.

Reagentes	Volume/Reação
DNA (25ng)	2-10µL
Tampão de seqüenciamento (Invitrogen®) (5X)	2µL
Big Dye (Invitrogen®)	2µL
Iniciadores (Cap A, Cap B1, Cap B2, Cap C, Cap D1, Cap D3)	2µL
H2O livre de Dnase/Rnase (Invitrogen®) q.s.p.	10 - 20µL

Os produtos obtidos na reação de sequenciamento foram a seguir purificados, utilizando-se as colunas CENTRI-SEP® (Princeton Separations®, CA, USA) e depois analisados no sequenciador automático ABI Prism 3130 (Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.2.8 ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SEQUENCIAS

As sequências parciais obtidas foram editadas e alinhadas utilizando-se o programa “BioEdit Sequence Alignment Editor” (HALL, 1999). Para a

análise filogenética foi utilizado o software MEGA4 versão 4.1 (TAMURA et al., 2007). A árvore filogenética foi construída, empregando-se o método Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987) e o modelo “Kimura 2-parameter” (KIMURA, 1980), com “bootstrap” de 1000 réplicas. Para comparar as sequências parciais das amostras de Juiz de Fora obtidas, foram utilizadas sequências de protótipos dos 18 genótipos de norovírus, publicadas no GenBank e obtidas no Portal (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar>) (quadro 7).

Para as análises de similaridade entre as sequências e obtenção da matriz de similaridade foi utilizado o programa LALIGN (HUANG & MILLER, 1991) disponível em: http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html.

Quadro 7: Número de acesso das sequências protótipos de norovírus (NoV) utilizadas neste estudo.

Vírus	Genogrupo	Genótipo	Número de acesso
NoV	II	1	U07611
NoV	II	2	X81879
NoV	II	3	U02030
NoV	II	4	X76716
NoV	II	5	AJ277607
NoV	II	6	AJ277620
NoV	II	7	AJ277608
NoV	II	8	AF195848
NoV	II	9	AY038599
NoV	II	10	AF427118
NoV	II	11	AB074893
NoV	II	12	AJ277618
NoV	II	13	AY113106
NoV	II	14	AY130761
NoV	II	15	AY130762
NoV	II	16	AY502010
NoV	II	17	AY502009
NoV	I	1	M87661

4.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS versão 13.0. A taxa de positividade e a associação com o sexo dos pacientes foram comparadas, utilizando-se o Teste Qui-Quadrado, estabelecendo-se um valor de $p < 0,05$, como significativo.

5. RESULTADOS

Neste estudo transversal foram analisadas 218 amostras fecais diarréicas, obtidas de crianças menores de 12 anos, coletadas na cidade de Juiz de Fora, no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2009, sendo 195 provenientes de pacientes ambulatoriais e 23 de hospitalizados. Todas foram testadas para a presença de norovírus, utilizando-se a reação de PCR, dirigida para região B da ORF1 do genoma destes vírus.

Neste período de estudo, foram detectadas 20 amostras positivas (figura 6, tabela 1), duas delas provenientes de pacientes hospitalizados, uma detectada no ano de 2008 e a outra em 2009.

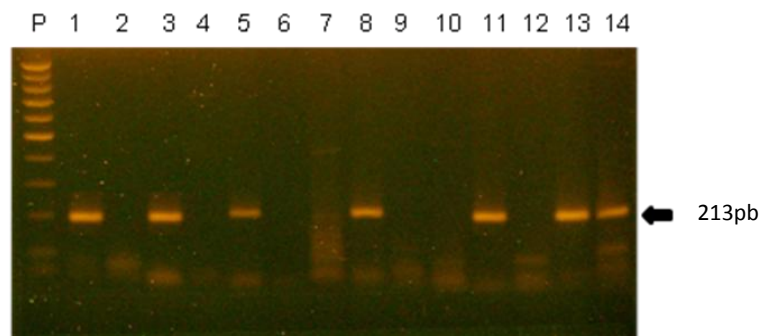


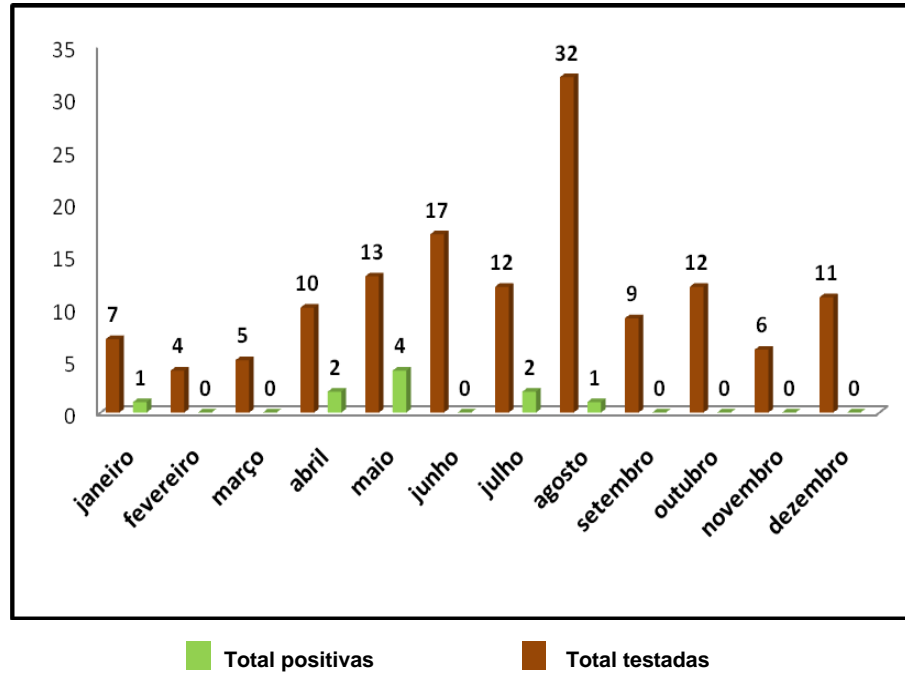
Figura 6: Gel de agarose 1,5%, após separação eletroforética, dos produtos de PCR para detecção dos NoV. (P) Padrão de tamanho de DNA (100 pb); (1) controle positivo; (2) controle negativo; (3,5,8,11,13,14) amostras positivas (213pb); (4, 6, 7, 9, 10, 12) amostras negativas. A seta aponta para o fragmento amplificado de 213pb, característico dos NoV, quando são utilizados os iniciadores Mon (431, 432, 433, 434).

Tabela 1: Detecção dos norovírus, em Juiz de Fora, MG, no período 2008- 2009.

ANO	AMOSTRAS TESTADAS	POSITIVAS NOROVÍRUS (%)
2008	138	10 (7,25%)
2009	80	10 (12,5%)
TOTAL	218	20 (9,17%)

A figura 7 mostra a distribuição temporal das amostras de norovírus positivas, detectadas nos dois anos do estudo. Em 2008, observou-se um predomínio na ocorrência das infecções no período de abril a agosto, quando 90% (9/10) das amostras positivas foram detectadas, enquanto que em 2009, as amostras positivas foram detectadas ao longo de vários meses do ano.

A



B

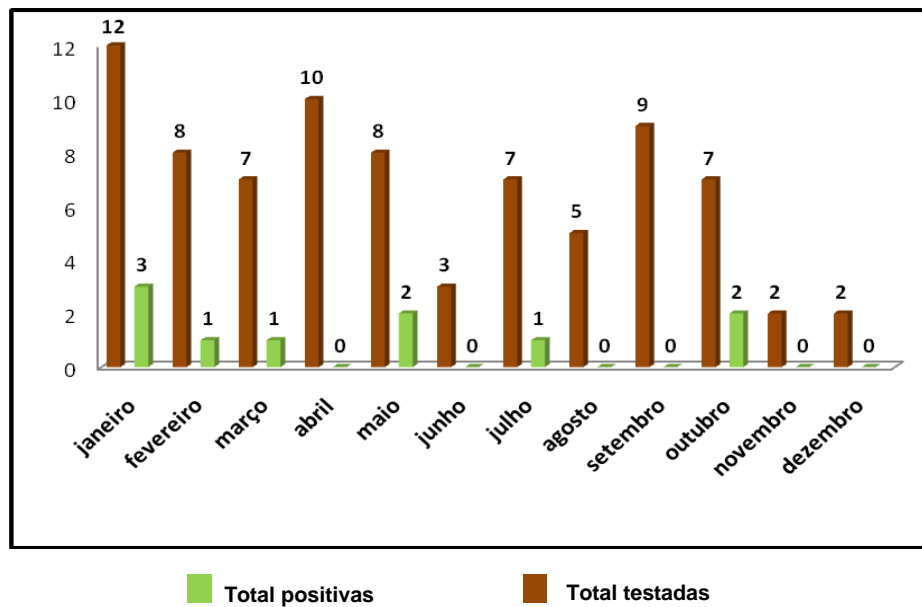


Figura 7 : Distribuição mensal das amostras testadas e positivas para norovírus, em 2008 (A) e 2009 (B).

A comparação da distribuição temporal das amostras positivas para norovírus, nos dois anos do estudo, mostrou uma tendência de ocorrência dessas infecções nos meses de janeiro, maio e julho (figura 8)

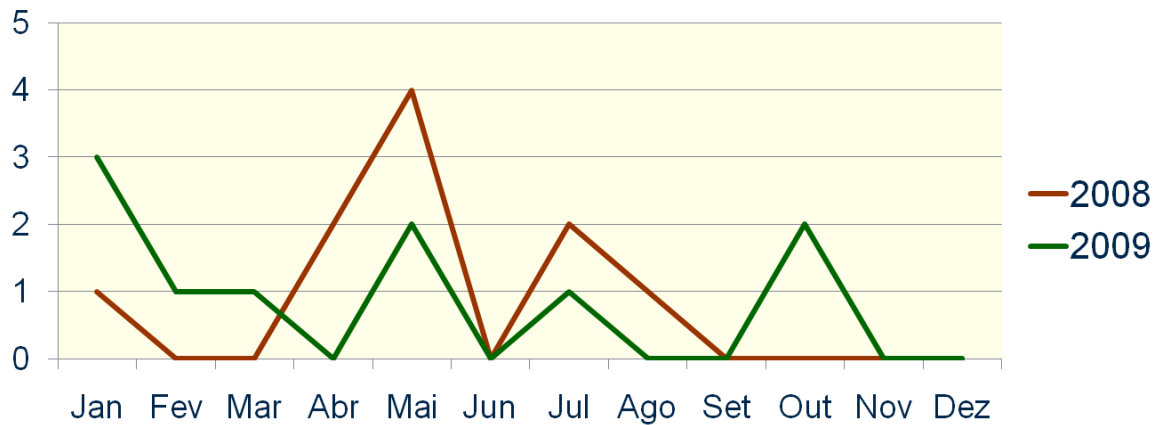


Figura 8: Distribuição temporal das amostras de norovírus detectadas nos anos de 2008 e 2009.

Na figura 9 estão relacionados a ocorrência dos casos positivos detectados com as médias mensais de temperatura e precipitação, nos dois anos de estudo. No ano de 2008, observou-se uma maior ocorrência das infecções no período de abril a agosto, no qual foram registradas as menores médias de temperatura e precipitação. No entanto, em 2009, embora a tendência dessas duas variáveis climáticas tenha sido semelhante ao ano anterior, o maior número de casos positivos foi observado fora do período em que foram registradas as menores médias de temperatura e precipitação.

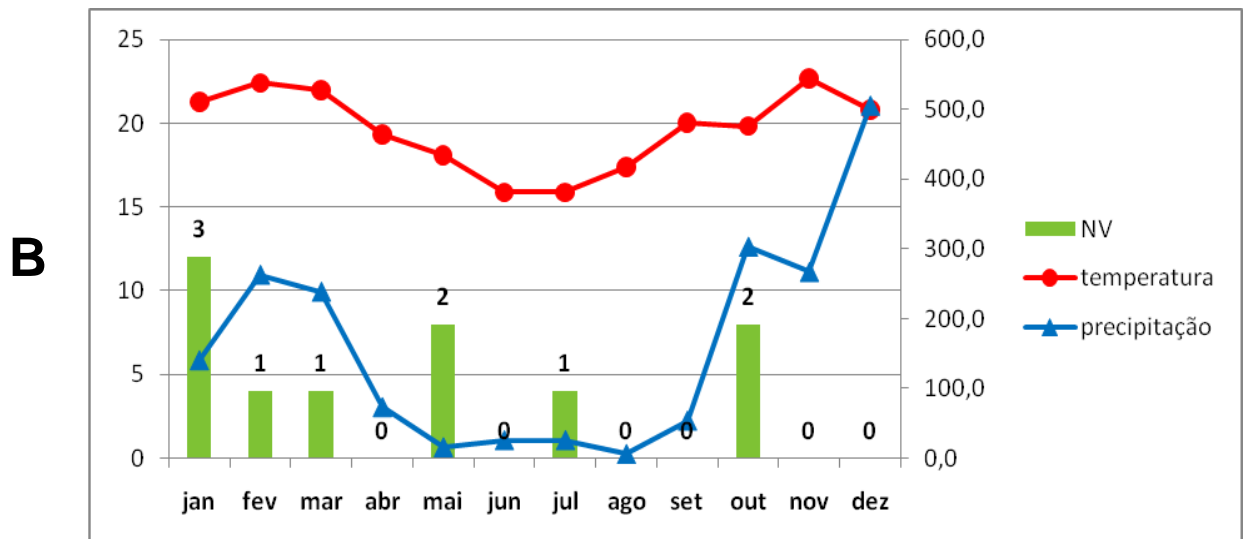
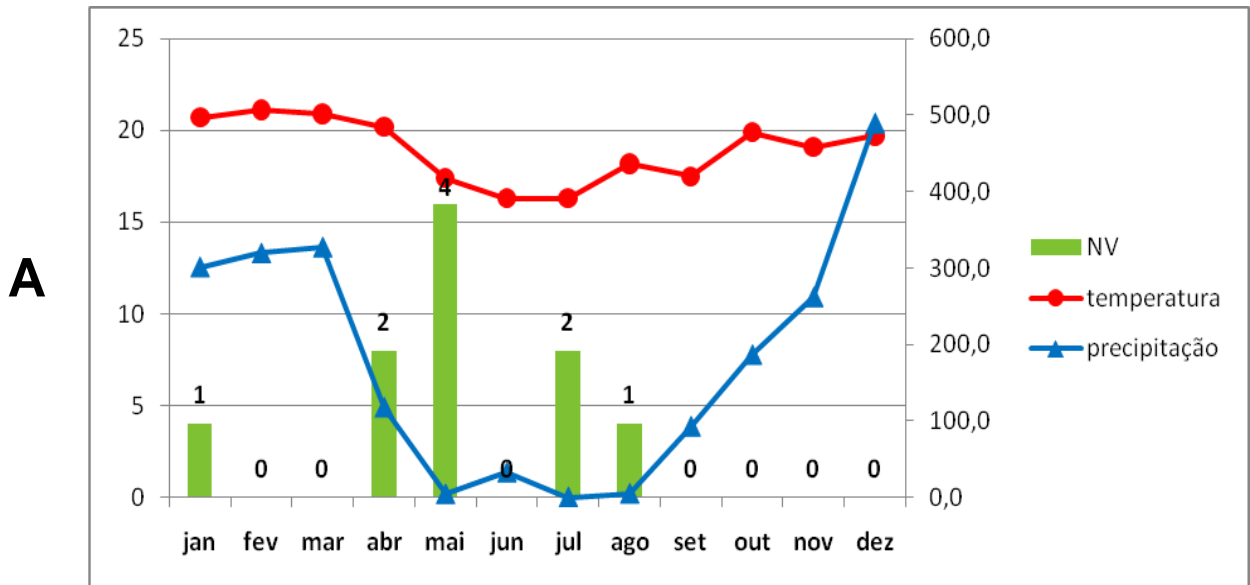


Figura 9: Distribuição mensal das amostras positivas para norovírus e valores médios de temperatura e precipitação no município de Juiz de Fora, em 2008 (A) e 2009 (B).

A distribuição das amostras positivas para norovírus por faixa etária, nos dois anos analisados, mostrou que 95% (19/20) dos casos ocorreram em crianças de até 36 meses (Figura 10).

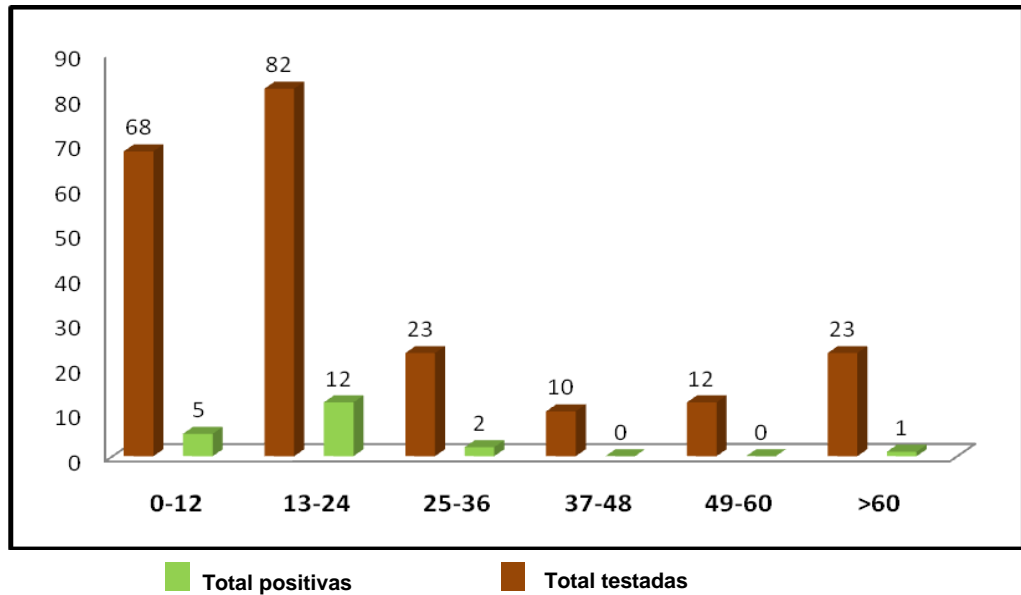


Figura 10 : Distribuição etária (em meses) dos norovírus, no ano de 2008 e 2009.

A figura 11 apresenta o percentual acumulado dos indivíduos infectados, por faixa etária, na qual pode se observar que, no ano de 2008, 90% dos casos positivos ocorreram em crianças de até 36 meses de idade, enquanto que em 2009, 100% dos casos positivos foram detectados em crianças até 24 meses.

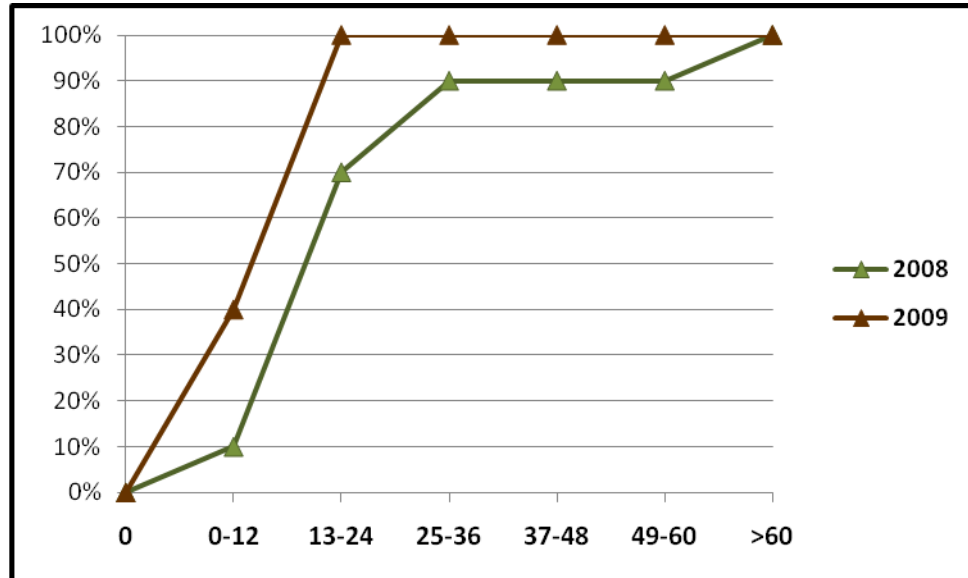


Figura 11: Percentual acumulado do grupo etário, em meses, das infecções causadas por norovírus dos anos de 2008 e 2009.

No que diz respeito à correlação entre os casos positivos da infecção com o sexo dos indivíduos acometidos (tabela 2), verificou-se que 8,41% (9/107) dos casos foram detectadas em crianças do sexo feminino e 9,34% (10/107) em crianças do sexo masculino. A análise estatística mostrou não haver diferença significativa entre os sexos, na ocorrência das infecções causadas por norovírus ($p= 0,810$).

Tabela 2: Distribuição por grupo etário e sexo das amostras testada no período 2008- 2009.

Grupo etário (meses)	Gênero								
	Masculino			Feminino			Sem Identificação		
	N° de casos estudados	N° de casos positivos	NoV (%)	N° de casos estudados	N° de casos positivos	NoV (%)	N° de casos estudados	N° de casos positivos	NoV (%)
0-12	25	2	8	40	2	5	3	1	33,33
13-24	43	7	16,28	39	5	12,82	0	0	0
25-36	14	0	0	9	2	22,22	0	0	0
37-48	5	0	0	5	0	0	0	0	0
49-60	9	0	0	2	0	0	0	0	0
>60	11	1	9,09	12	0	0	1	0	0
Total	107	10	9,34	107	9	8,41	4	1	25

(p= 0,810)

A caracterização molecular das 20 amostras positivas que foram submetidas à PCR da região D (ORF2), para a determinação de seus genogrupos, classificou 13 delas. Assim, das 6 amostras de 2008, 5 foram classificadas como GII e 1 como GI, enquanto que das 7 amostras de 2009, todas foram classificadas como GII (figura 12). Não foi possível determinar o genogrupo de 7 das 20 amostras positivas (4 de 2008 e 3 de 2009) utilizando-se este protocolo, mesmo após várias tentativas. Por isso, com o objetivo de definir o genogrupo destas amostras, elas foram submetidas novamente a PCR da região B (ORF1). Neste protocolo, os iniciadores Mon foram empregados em reações separadas para a caracterização do genogrupo I (Mon432,434) e genogrupo II (Mon 431,433). Dessa forma, foi possível definir o genogrupo das 7 amostras remanescentes pertencentes ao genogrupo II (figura 12).

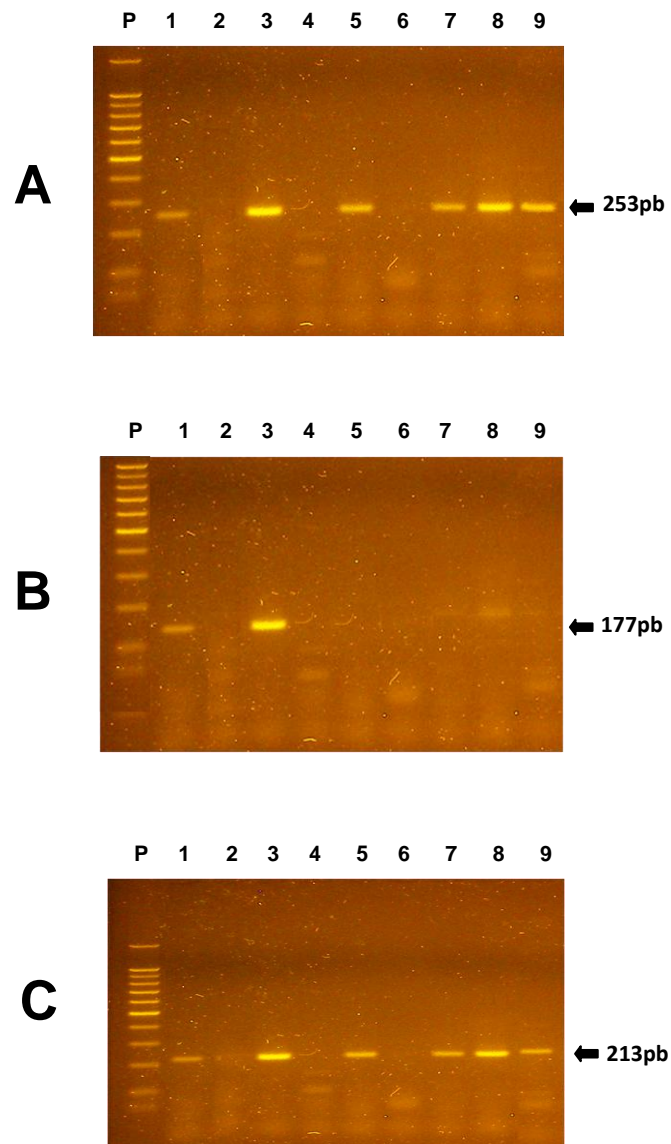


Figura 12: Gel de agarose 1,5%, após separação eletroforética, dos produtos de PCR para caracterização dos NoV nos genogrupos I e II. (P): Padrão de tamanho de DNA (100 pb); (1) controle positivo; (2) controle negativo. (A) Gel de agarose dos produtos de PCR da região D (ORF2) para caracterização do genogrupo II: (3,5,7,8,9) amostras positivas GII (253pb); (4,6) amostras negativas. (B) Gel de agarose dos produtos de PCR da região D (ORF2) para caracterização do genogrupo I: (3) amostra positiva GI (177pb); (4,5,6,7,8,9) amostras negativas. (C) Gel de agarose dos produtos de PCR da região B (ORF1) para caracterização do genogrupo II: (3,5,7,8,9) amostras positivas GII (213pb); (4,6) amostras negativas.

Assim, utilizando-se ambos os protocolos da PCR (região D/ORF2 e região B/ORF1), definiu-se o genogrupos das 20 amostras positivas detectadas neste estudo (tabela 3).

Tabela 3: Caracterização molecular, quanto ao genogrupo viral, das amostras de norovírus detectadas em 2008 e 2009.

Anos	Amostras positivas	Caracterização			
		REGIÃO D		REGIÃO B	
		GII	GI	GII	GI
2008	10	5	1	4	0
2009	10	7	0	3	0
TOTAL	20	12	1	7	0

Após a caracterização das amostras quanto ao genogrupo viral, 11 das 13 amostras genogrupadas pela PCR da região D, cujas bandas esperadas apresentaram, visualmente, uma boa quantidade de DNA, foram selecionadas para a realização da reação de sequenciamento, visando identificar o genótipo viral. A tabela 4 apresenta a lista de todas as amostras detectadas, com a indicação das 11 selecionadas para a reação de sequenciamento.

Tabela 4: Relação das amostras positivas para norovírus, nos anos de 2008 e 2009.

RT-PCR positiva	Código da amostra	Idade	Ano	Procedência	Genogrupo	Sequenciamento
1	JF 705	2 anos	2008	Ambulatório	GII	Sim
2	JF743	10m	2008	Ambulatório	GII	Não
3	JF 247	1a 6m	2008	Ambulatório	GII	Sim
4	JF 740	1a 2m	2008	Ambulatório	GII	Não
5	JF 709	1a9m	2008	Hospitalar	GII	Sim
6	JF 536	3a	2008	Ambulatório	GI	Não
7	JF 255	1a6m	2008	Ambulatório	GII	Não
8	JF 463	2a 4m	2008	Ambulatório	GII	Sim
9	JF 330	12a	2008	Ambulatório	GII	Sim
10	JF 735	1a 7m	2008	Ambulatório	GII	Não
11	JF 712	2a	2009	Ambulatório	GII	Sim
12	JF 560	7m	2009	Ambulatório	GII	Sim
13	JF 736	1a	2009	Hospitalar	GII	Não
14	JF 734	1a 2m	2009	Ambulatório	GII	Não
15	JF 569	20m	2009	Ambulatório	GII	Sim
16	JF 572	21m	2009	Ambulatório	GII	Sim
17	JF 737	22m	2009	Ambulatório	GII	Não
18	JF 600	9m	2009	Ambulatório	GII	Não
19	JF 661	14m	2009	Ambulatório	GII	Sim
20	JF 662	6m	2009	Ambulatório	GII	Sim

As sequências parciais obtidas, das 11 amostras detectadas em Juiz de Fora, foram comparadas com as sequências de protótipos dos 18 genótipos de norovírus descritos na literatura. A análise filogenética permitiu identificar 6 amostras do genótipo 4 (GII.4) e 5 amostras do genótipo 6 (GII.6) (figura 13).

A tabela 5 apresenta a relação das amostras de norovírus detectadas em Juiz de Fora, de acordo com o ano da coleta, procedência e genótipo.

Tabela 5: Descrição das 11 amostras de norovírus GII sequenciadas.

Amostras	Ano	Procedência	Genótipo
JF 705	2008	COMUNIDADE	GII.4
JF 247	2008	COMUNIDADE	GII.4
JF 709	2008	HOSPITALAR	GII.4
JF 463	2008	COMUNIDADE	GII.6
JF 330	2008	COMUNIDADE	GII.6
JF 712	2009	COMUNIDADE	GII.4
JF 560	2009	COMUNIDADE	GII.6
JF 569	2009	COMUNIDADE	GII.6
JF 572	2009	COMUNIDADE	GII.6
JF 661	2009	COMUNIDADE	GII.4
JF 662	2009	COMUNIDADE	GII.4

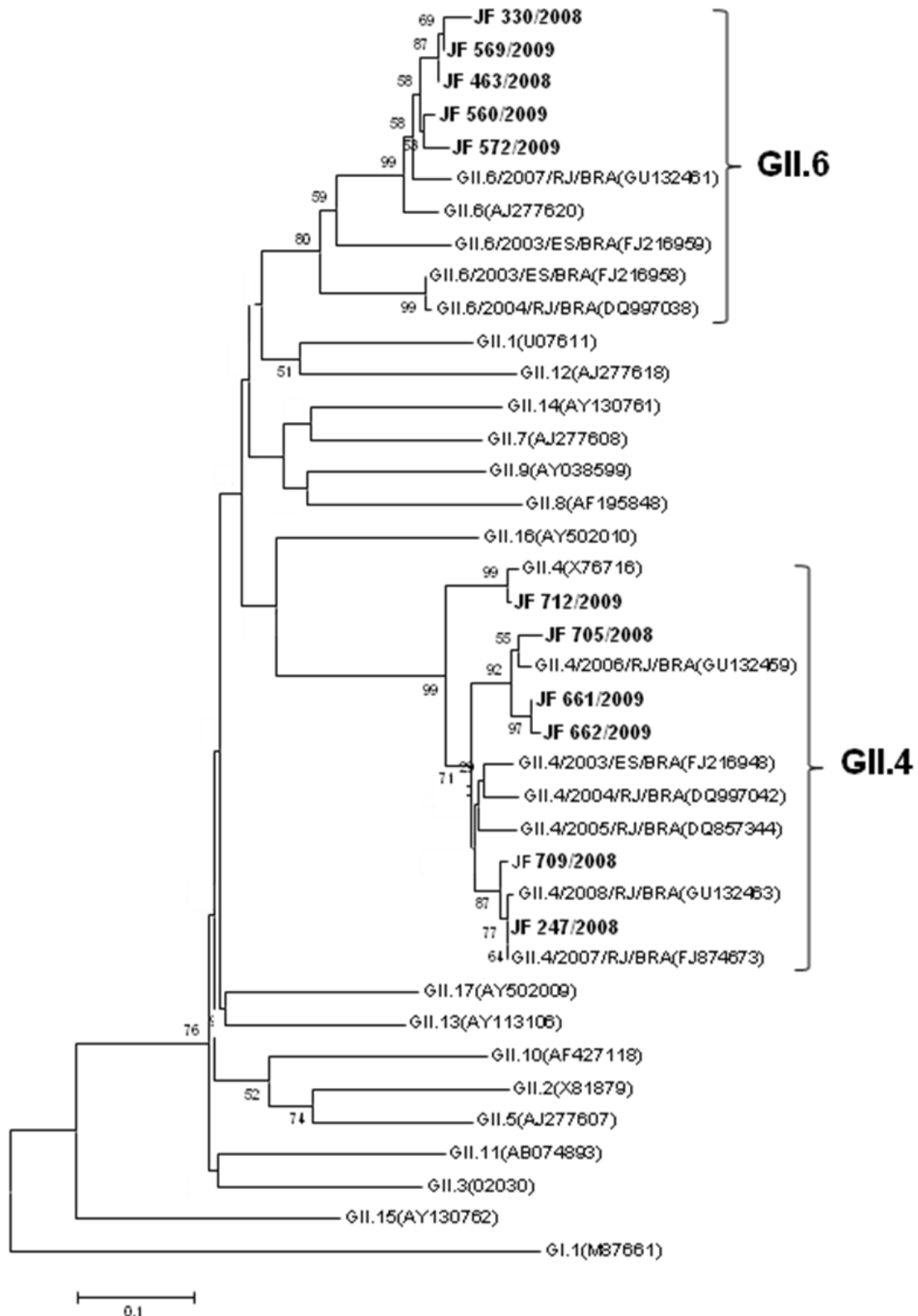


Figura 13: Árvore filogenética obtida a partir da análise das sequências parciais de nucleotídeos da região D da ORF2, que codifica a proteína VP1 do capsídeo dos norovírus. O programa MEGA 4, versão 4.1 foi utilizado, empregando-se o método “Neighbor-Joining” e o modelo “Kimura 2-parameter” com “Bootstrap” de 1000 réplicas. Para a construção da árvore foram utilizadas as sequências obtidas neste estudo e sequencias de outras amostras brasileiras e dos protótipos disponíveis, obtidas no Portal Entrez Pubmed GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar>). Apenas valores de “Bootstrap” acima de 50% foram mostrados.

O quadro 8 apresenta os valores de similaridade de nucleotídeos e de aminoácidos das sequências parciais das amostras GII.4 detectadas em Juiz de Fora, em comparação com o protótipo GII.4 (“*Bristol virus*”) e outras amostras do mesmo genótipo que circularam no país em anos anteriores.

As amostras NoV GII.4 detectadas em Juiz de Fora apresentaram um valor máximo de divergência de 12,6% entre elas e similaridade nucleotídica com o protótipo GII.4 (“*Bristol virus*”), que variou de 86,2% a 98,8%. Já com relação às outras amostras brasileiras, verificou-se similaridade nucleotídica variando de 90,4% a 98,8% com a amostra (FJ216948) que circulou no estado do Espírito Santo, no ano de 2003 e de 87,4% a 100% com amostras do estado do Rio de Janeiro, que circularam nos anos de 2004 a 2008 (DQ997042, DQ857344, GU132459, FJ874673, GU132463). Em relação à similaridade nas sequências de aminoácidos, o máximo de divergência entre as amostras de Juiz de Fora foi de 9,1% e a similaridade com o protótipo GII.4 variou de 90,9% a 98,2%. Já com relação às outras amostras brasileiras verificou-se similaridade variando de 94,5% a 100% com a amostra (FJ216948) que circulou no estado do Espírito Santo, no ano de 2003, e de 92,7% a 100% com as amostras NoV GII.4 que circularam no estado do Rio de Janeiro nos anos de 2004 a 2008 (DQ997042, DQ857344, GU132459, FJ874673, GU132463).

Quadro 8: Matriz de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos das amostras de norovírus genótipo 4.

Amostras NoV GII.4	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)
JF 705/2008 (1)		98,2%	96,4%	92,7%	98,2%	96,4%	90,9%	98,2%	96,4%	98,2%	96,4%	98,2%	98,2%
JF 247/2008 (2)	91,6%		98,2%	94,5%	100%	98,25	92,7%	100%	98,2%	100%	98,2%	100%	100%
JF 709/2008 (3)	91,6%	98,8%		94,5%	98,2%	96,4%	92,7%	98,2%	96,4%	98,2%	96,4%	98,2%	98,2%
JF 712/2009 (4)	89,2%	90,4%	89,8%		92,7%	90,9%	98,2%	94,5%	92,7%	94,5%	92,7%	94,5%	94,5%
JF 661/2009 (5)	96,4%	91,6%	91,6%	88%		98,2%	92,7%	100%	98,2%	100%	98,2%	100%	100%
JF 662/2009 (6)	95,8%	91%	91%	87,4%	99,4%		90,9%	98,2%	96,4%	98,2%	96,4%	98,2%	98,2%
PROTÓTIPO (X76716) (7)	88%	89,2%	88,6%	98,8%	86,8%	86,2%		92,7%	90,9%	92,7%	90,9%	92,7%	92,7%
FJ216948 (ES/2003) (8)	92,2%	95,8%	94,6%	98,8%	91%	90,4%	89,8%		98,2%	100%	98,2%	100%	100%
DQ997042 (RJ/2004) (9)	91,6%	94%	92,8%	90,4%	90,4%	89,8%	89,2%	94,6%		98,2%	98,2%	98,2%	98,2%
(DQ857344) (RJ/2005) (10)	91%	94,6%	93,4%	91%	92,2%	91,6%	89,8%	94%	93,4%		98,2%	100%	100%
(GU132459) (RJ/2006) (11)	97%	92,2%	92,2%	87,4%	95,8%	95,2%	86,2%	92,8%	92,8%	90,4%		98,2%	98,2%
(FJ874673) (RJ/2007) (12)	91,6%	100%	98,8%	90,4%	91,6%	91%	89,2%	95,8%	94%	94,6%	92,2%		100%
(GU132463) (RJ/2008) (13)	92,2%	99,4%	99,4%	89,8%	92,2%	91,6%	88,6%	95,2%	93,4%	94%	92,8%	99,4%	

Sequências alinhadas e comparadas com o programa LALIGN. Valores de similaridade de nucleotídeos apresentados na parte inferior esquerda e valores de similaridade de aminoácidos na parte superior direita.

A figura 14 apresenta as variações de nucleotídeos das sequências parciais de NoV GII.4 detectadas em Juiz de Fora, comparando com o protótipo GII.4 (“*Bristol virus*”) e com amostras brasileiras detectadas no estado do Espírito Santo, no ano de 2003 e no estado do Rio de Janeiro de 2004 a 2008.

PROTÓTIPO	CCA	GCA	CAA	TCC	GAT	GTG	GCA	CTG	CTG	AGA	TTT	GTG	AAT
JF- 705	.A.TT	..A	T..
JF -247TTA
JF -709TTA
JF -712
JF -661TT	..A	T..
JF- 662TT	..A	T..
FJ216948ESTT	...	T.A
DQ997042RJTT	T..C
DQ857344RJTA
GU132459RJTT	T.A	T.A
FJ874673RJTTA
GU132463RJTTA

PROTÓTIPO	CCA	GAT	ACA	GGT	AGG	GTT	CTG	TTT	GAG	TGC	AAG	CTT	CAT
JF- 705GCA
JF -247CT
JF -709CCT
JF -712
JF -661C	..GC	T..AA
JF- 662C	..GC	T..	C..	..AA
FJ216948ESCA
DQ997042RJC
DQ857344RJC	T..
GU132459RJC	..GCA
FJ874673RJCT
GU132463RJCT

PROTÓTIPO	AAA	TCA	GGC	TAT	ATC	ACA	GTG	GCC	CAC	ACC	GGC	CCG	TAT
JF- 705	G..TA	C..
JF -247	G..TTAA	C..
JF -709	G..TTAA	C..
JF -712	C..
JF -661	G..TAA	C..
JF- 662	G..TAA	C..
FJ216948ES	G..TTA	C..
DQ997042RJ	...	A..	G..TTA	C..
DQ857344RJ	G..TT	..T	..AA	C..
GU132459RJ	...	C..	G..ATA	C..
FJ874673RJ	G..TTAA	C..
GU132463RJ	G..TTAA	C..

PROTÓTIPO	GAT	TTG	GTT	CTC	CCC	CCT	AAT	GGT	TAT	TTC	AGA	TTT	GAT
JF- 705C	A..CCT	..G
JF -247A	...	A..CCT	..G
JF -709A	...	G..CCT	..G
JF -712C
JF -661C	A..CT	..G
JF- 662C	A..CT	..G
FJ216948ES	A..CC	..C	..T
DQ997042RJ	A..CCTC
DQ857344RJ	A..CCT
GU132459RJC	A..CCT	..G
FJ874673RJA	...	A..CCT	..G
GU132463RJA	..C	A..CCT	..G

PROTÓTIPO	TCT	TGG	GTC	AA
JF- 705	..CT	..
JF -247	..C
JF -709	..C
JF -712
JF -661	..CT	..
JF- 662	..CT	..
FJ216948ES	..C
DQ997042RJ	..CT	..
DQ857344RJ	..C
GU132459RJ	..CT	..
FJ874673RJ	..C
GU132463RJ	..C

Figura 14: Sequências parciais de nucleotídeos do gene que codifica a proteína VP1 do capsídeo dos norovírus. Comparação das amostras detectadas neste estudo com as amostras brasileiras FJ216948 (ES/2003), DQ997042RJ (RJ/2004), DQ857344RJ (RJ/2005), GU132459RJ (RJ/2006), FJ874673RJ (RJ/2007), GU132463 (RJ/2008) e o protótipo GII.4 “Bristol virus” .

A comparação das sequências parciais de aminoácidos das amostras de Juiz de Fora com as sequências do protótipo GII.4 e das demais amostras brasileiras (figura 15) mostrou substituições comuns em quatro posições residuais para as amostras JF-247, JF-661, FJ216948ES/2003, DQ857344RJ/2005, FJ874673RJ/2007, U132463RJ/ 2008. Assim, as amostras JF-247, do ano de 2008, e a amostra JF-661, do ano de 2009, apresentaram sequências de aminoácidos 100% similares entre si e com outras amostras brasileiras que circularam no estado do Espírito Santo em 2003 e no estado do Rio de Janeiro nos anos de 2005, 2007 e 2008.

PROTÓTIPO	PAQSDVALLRFVNPDTGRVLFECKLHKSGYITVAHTGPYDLVLPNGYFRFDSWV
JF -705	Q.....V.....QH...I.....
JF -247V.....QH...I.....
JF -709V.....QH...V.....
JF -712H.....
JF -661V.....QH...I.....
JF -662L.....V.....QH...I.....
FJ216948ESV.....QH...I.....
DQ997042RJT..V.....QH...I.....
DQ857344RJV.....QH...I.....
GU132459RJP..V.....QH...I.....
FJ874673RJV.....QH...I.....
GU132463RJV.....QH...I.....

Figura 15: Sequências de aminoácidos deduzidas das sequências parciais de nucleotídeos de um fragmento do gene que codifica para a proteína VP1 do capsídeo dos norovírus. Comparação entre as amostras analisadas neste estudo com as amostras brasileiras FJ216948 (ES/2003), DQ997042RJ (RJ/2004), DQ857344RJ (RJ/2005), GU132459RJ (RJ/2006), FJ874673RJ (RJ/2007), GU132463 (RJ/2008) e o protótipo GII.4 "Bristol virus".

O quadro 9 apresenta os valores de similaridade nucleotídica e de aminoácidos entre as amostras NoV GII.6 detectadas em Juiz de Fora, em comparação com o protótipo GII.6 (AJ277620) e outras amostras do mesmo genótipo que circularam no país, em anos anteriores.

As amostras NoV GII.6, detectadas em Juiz de Fora, apresentaram um valor máximo de divergência de 4,8% entre elas e similaridade nucleotídica com o protótipo GII.6 (AJ277620), que variou de 92,8% a 94,6%. Já com relação às outras amostras brasileiras, verificou-se similaridade nucleotídica variando de 79,6% a 83,8% com duas amostras (FJ216958, FJ216959) que circularam no estado do Espírito Santo em 2003 e de 79% a 95,2% com amostras que circularam no estado do Rio de Janeiro em 2004 (DQ997038) e 2007 (GU132461). A maior similaridade das amostras detectadas neste estudo foi observada com a amostra NoV GII.6 (GU132461/2007), que circulou no Estado do Rio de Janeiro em 2007. Com relação à similaridade

nas sequências de aminoácidos, o máximo de divergência entre as amostras de Juiz de Fora foi de 7,3% e a similaridade com o protótipo GII.6 (AJ277620) variou de 94,5% a 100%. Já com relação às outras amostras brasileiras, verificou-se similaridade variando de 89,1% a 96,4% com as amostras (FJ216958; FJ216959) que circularam no estado do Espírito Santo, no ano de 2003, e de 90,9% a 100% com amostras NoV GII.6 que circularam no estado do Rio de Janeiro nos anos de 2004 (DQ997038) e 2007 (GU132461).

Quadro 9: Matriz de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos, das amostras de norovírus GII.6.

Amostras NoV GII.6	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
JF 330/2008 (1)		92,7%	92,7%	94,5%	94,5%	94,5%	90,9%	89,1%	90,9%	94,5%
JF463/2008 (2)	97,6%		96,4%	98,2%	96,4%	98,2%	94,5%	92,7%	94,5%	98,2%
JF560/2009 (3)	95,2%	96,4%		98,2%	96,4%	98,2%	94,5%	92,7%	94,5%	98,2%
JF569/2009 (4)	98,2%	99,4%	97%		98,2%	100%	96,4%	94,5%	96,4%	100%
JF572/2009 (5)	95,2%	95,8%	97%	96,4%		98,2%	94,5%	92,7%	94,5%	98,2%
PROTÓTIPO (AJ277620) (6)	92,8%	94%	94%	94,6%	94%		96,4%	94,5%	96,4%	100%
FJ216958 (ES/2003) (7)	80,2%	81,4%	79,6%	82%	80,8%	82,6%		94,5%	100%	96,4%
FJ216959 (ES/2003) (8)	82%	83,2%	82,6%	83,8%	82,6%	83,8%	83,2%		98,2%	94,5%
DQ997038 (RJ/2004) (9)	79,6%	80,8%	79%	81,4%	80,2%	82%	99,4%	82,6%		96,4%
GU132461 (RJ/2007) (10)	93,4%	94,6%	94,6%	95,2%	94%	93,4%	81,4%	82%	80,8%	

Sequências alinhadas e comparadas com o programa LALIGN. Valores de similaridade de nucleotídeos apresentados na parte inferior esquerda e valores de similaridade de aminoácidos na parte superior direita.

A figura 16 apresenta as variações de nucleotídeos das sequências parciais de NoV GII.6 detectadas em Juiz de Fora, comparadas com o protótipo GII.6 (AJ277620), com amostras detectadas no estado do Espírito Santo no ano de 2003 e com amostras detectadas no estado do Rio de Janeiro, nos anos de 2004 e 2007.

PROTÓTIPO	CCA	TCA	CAA	TCC	GCT	GTT	GCA	CTG	GTT	AGG	TAT	GTC	AAC
JF- 330	..TTTT.
JF -463	..TT	.G.
JF -560	..TT	T..T	...
JF -569	..TT
JF -572	..CGTT	...
FJ216958/EST	..C	..GC	A..T
FJ216959/ESG	..A	..T	..T	A..	..A
DQ997038/RJCT	..C	..GC	A..T
GU132461/RJ	..TG	..TCT	...

PROTÓTIPO	CCT	GAT	ACT	GGG	CGT	AAC	ATC	TTT	GAG	GCC	AAG	TTA	CAC
JF- 330	..C	..CAT
JF -463	..C	..CAT
JF -560	..C	..C	C..T
JF -569	..C	..CAT
JF -572	..C	..CT
FJ216958/ESC	..A	..C	A.AT	..A	..G
FJ216959/ESC	A.AAGT
DQ997038/RJC	..A	..C	A.AT	..A	..G
GU132461/RJ	..C	..C

PROTÓTIPO	AGA	GAA	GGG	TTC	CTC	ACC	GTG	GCT	AAT	TCT	GGA	AAT	AAT
JF- 330CC	...
JF -463CC	...
JF -560CC	...
JF -569CC	...
JF -572	..GC	...
FJ216958/ES	..GT	...	A..ACC
FJ216959/ES	A..	..TACC
DQ997038/RJ	..GT	...	A..ACC
GU132461/RJCC

PROTÓTIPO	CCT	ATT	GTG	GTT	CCC	CCT	AAT	GGC	TAT	TTT	AGA	TTT	GAG
JF- 330T.	..T
JF -463T
JF -560T
JF -569T
JF -572T
FJ216958/ES	..CT	..CCGC	..GA
FJ216959/ESA	..T	..GAT	..C	..C	..G
DQ997038/RJ	..CT	..CCGC	..GA
GU132461/RJAT

PROTÓTIPO	GCT	TGG	GTT	AA
JF- 330
JF -463
JF -560
JF -569
JF -572
FJ216958/ESG	..
FJ216959/ES	..CC	..
DQ997038/RJG	..
GU132461/RJ

Figura 16: Sequências parciais de nucleotídeos de um fragmento do gene que codifica para a proteína VP1 do capsídeo dos norovírus. Comparação entre as amostras analisadas neste estudo com a amostra brasileira GU132461 (RJ/2007) e com o protótipo GII.6 (AJ277620).

Quando as sequências parciais de aminoácidos das amostras de Juiz de Fora foram comparadas com a sequência do protótipo GII.6 e das demais amostras brasileiras (figura 17), observou-se que as amostras JF-569, o protótipo NoV GII.6 (AJ277620) e a amostra GU132461/RJ/2007 apresentaram sequências 100% similares entre si.

PROTÓTIPO	PSQSAVALVRYVNPDTGRNIFEAKLHREGFLTVANSNGNNPIVPPNGYFRFEAWV
JF -330	...F..V.....I.....
JF -463G.....
JF -560L.....
JF -569
JF -572	...C.....
FJ216958/ESI.....I.....
FJ216959/ESI.....Y.....I.....
DQ997038/RJI.....I.....
GU132461/RJ

Figura 17: Sequências de aminoácidos deduzidas das seqüências parciais de nucleotídeos de um fragmento do gene que codifica para a proteína VP1 do capsídeo dos norovírus. Comparação entre as amostras analisadas neste estudo com as amostras brasileiras Comparação entre as amostras analisadas neste estudo com a amostra brasileira GU132461 (RJ/2007) e o protótipo GII.6 (AJ277620).

6. DISCUSSÃO

A doença diarréica aguda é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil, ocupando em alguns países, como nos EUA, a segunda posição no quadro de notificação, seguida das infecções respiratórias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Nos países em desenvolvimento, a doença é impactante na saúde pública, pois além de um grande número de casos e de hospitalizações, acarreta também alta taxa de óbitos, principalmente em crianças de pouca idade (PATEL et al., 2009; BLACK et al., 2010).

Embora os norovírus tenham sido os primeiros vírus relacionados com a doença diarréica humana, na década de 70, sua importante participação na gênese desta doença só foi efetivamente constatada a partir da década de 90, após o grande desenvolvimento e utilização das técnicas de clonagem e sequenciamento deste genoma viral. Desde então, tem sido demonstrado o expressivo envolvimento desses vírus, que passaram a ocupar um lugar de destaque na etiologia da doença diarréica aguda em indivíduos de todas as idades, no mundo todo (BON et al., 2005; PATEL et al., 2009).

Pesquisas que avaliam a associação de norovírus humanos com a doença diarréica aguda tem sido realizadas em vários países do mundo, com resultados amplamente documentados na literatura. Entretanto, no Brasil, apenas alguns trabalhos pontuais tem sido realizados nas principais instituições de pesquisa do país, com levantamentos restritos aos grandes centros urbanos e áreas próximas.

No Brasil, a doença diarréica não faz parte do conjunto de doenças nacionais de notificação compulsória, o que requer um olhar mais cauteloso quanto aos índices divulgados, principalmente, devido ao grande número de casos subdiagnósticos, que mascaram os números reais (FAÇANHA; PINHEIRO, 2005; ROCHA, 2010). Neste contexto, este estudo avaliou a prevalência e a circulação dos norovírus, associados a casos esporádicos da doença diarréica aguda, que acometeram pacientes pediátricos atendidos em

serviços de saúde da cidade de Juiz de Fora, durante o período de janeiro de 2008 a dezembro de 2009.

Neste levantamento foi utilizada a técnica de extração de ácido nucléico, descrita por Boom et al. (1990), por ser considerada capaz de eliminar substâncias inibidoras da RT-PCR e o RNA extraído apresentar qualidade similar aos obtidos com a utilização de kits comerciais (ATMAR e ESTES, 2001; FERREIRA et al., 2010). Na triagem das amostras positivas, os dois pares de iniciadores Mon foram utilizados numa única reação por permitirem a detecção simultânea de norovírus pertencentes aos genogrupos I (Mon 432, 434) e II (Mon 431, 433). Além de menos dispendioso, este protocolo de detecção apresentou sensibilidade comparável a aquele da reação de PCR em tempo real, específica para norovírus (FERREIRA et al., 2008).

Os resultados da pesquisa, baseados na população e no período de estudo, mostraram que a prevalência da infecção pelos norovírus foi de 9,17%, valor consoante com o encontrado em outros trabalhos brasileiros, também envolvendo casos esporádicos da doença, cujos índices de positividade para estes vírus variaram de 7% a 35,1% dos casos analisados (BORGES et al., 2006; CASTILHO et al., 2006, SOARES et al., 2007, VICTORIA et al., 2007; FERREIRA et al., 2010).

Ao analisar os anos do estudo separadamente, no ano de 2009, a taxa de detecção foi maior que aquela observada no ano de 2008. As diferenças nas taxas de detecção, observadas em estudos realizados em anos subsequentes, tem sido comumente relatadas por alguns pesquisadores, no Brasil e no mundo (SOARES et al., 2007; PATEL et al., 2008). Dentre os vários aspectos que envolvem a detecção de norovírus e os resultados encontrados, um deles diz respeito aos diferentes protocolos de RT-PCR utilizados, que envolvem diferentes regiões do genoma (ORF1, ORF2, ORF1/ORF2). Assim, possivelmente, as diferenças nas taxas de detecção para norovírus, encontradas entre os diferentes estudos, sejam resultantes da grande variabilidade genética que estes vírus apresentam, além dos distintos oligonucleotídeos e metodologias empregadas (DE BRUIN et al., 2006; MATTISON et al., 2009).

Neste estudo, poucas amostras foram provenientes de pacientes hospitalizados (23/218), porém, a presença de norovírus, como único agente viral detectado (sem co-infecção com rotavírus, astrovírus e adenovírus - dados não mostrados) em algumas dessas amostras analisadas, sugere que a infecção não foi suficientemente branda para ser resolvida com cuidados caseiros ou para que o paciente pudesse esperar até uma consulta ambulatorial de rotina. Nesse sentido, este achado confirma a participação destes agentes, tanto em casos brandos, quanto em casos mais severos da doença em que se faz necessária a hospitalização, reiterando dados já descritos na literatura, de que os norovírus são importantes agentes associados à internação de crianças que apresentam quadro de diarreia aguda (SOARES et al., 2007, VICTORIA et al., 2007; PATEL et al., 2008).

A análise da distribuição temporal das infecções por norovírus mostrou que houve diferenças nos dois anos em que o estudo foi realizado. No ano de 2008, as amostras positivas foram detectadas de abril a agosto, período que compreende as estações de outono a inverno, com apenas uma exceção, relativa a uma amostra detectada no mês de janeiro. Por outro lado em 2009, as amostras positivas foram detectadas de janeiro a outubro, com exceção dos meses de novembro e dezembro, logo, presentes praticamente em todas as estações do ano. A análise comparativa da distribuição temporal dos casos positivos permitiu observar, entretanto, uma tendência de ocorrência das infecções nos meses de maio e julho, em ambos os anos. Esses achados se aproximam dos resultados apresentados por um estudo de vigilância das infecções por norovírus, realizado no estado do Rio de Janeiro de 2005 a 2008, no qual também foi observada a presença de norovírus em diferentes meses do ano, com relato de um pico de maior ocorrência, também no mês de julho (FEREIRA et al., 2010).

A avaliação da influência da temperatura e precipitação sobre a ocorrência das infecções pelos norovírus mostrou que, em 2008, a maioria das amostras positivas foi detectada no período, no qual foram registradas as menores médias de temperatura e de precipitação. Esse achado se aproxima dos resultados relatados por Victoria et al. (2007), em estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro, na região sudeste, no qual foi observada a existência de uma relação inversamente proporcional entre a frequência de

detecção dos norovírus e os índices pluviométricos, associando, dessa forma, a detecção destes vírus aos períodos mais secos do ano, na região analisada. Tal associação também foi relatada por Borges et al. (2006), em levantamento realizado na cidade de Goiânia, região Centro-oeste, no qual os calicivírus foram detectados em todos os meses do estudo, com picos de maior ocorrência nos meses de abril a agosto, durante a estação seca da região analisada.

Por outro lado, no ano de 2009, diferentemente do observado no ano anterior, as amostras positivas foram detectadas ao longo do ano, não sendo possível associar uma maior ocorrência destas infecções a um único período. Neste ano, a detecção de amostras positivas ocorreu durante os meses de maiores e menores temperaturas e índices pluviométricos, ou seja, nos dois períodos bem definidos do clima de Juiz de Fora, que é caracterizado por uma estação seca (com temperaturas menores e pouca chuva) e uma estação úmida (temperaturas mais elevadas e muita chuva). Esse dado, por sua vez, se aproxima dos resultados relatados por Barreira et al. (2010), em estudo realizado na cidade de Vitória, ES, também na região sudeste do Brasil, no qual os norovírus foram detectados em quase todos os meses do ano.

Embora alguns autores já tenham relatado a ocorrência de padrões de sazonalidade para as infecções por norovírus (PARASHAR et al., 2004; PHAN et al., 2004, FRETZ et al., 2005; VICTORIA et al., 2007), esta característica não é sempre observada, visto que alguns estudos, inclusive realizados no Brasil, já relataram variação ou ausência de sazonalidade (O'RYAN et al., 2000; ZINTZ et al., 2005; BORGES et al., 2006; SOARES et al., 2007; NAKAGOMI et al., 2008; BARREIRA et al., 2010). Assim, dados divergentes quanto à sazonalidade tem sido comumente relatado na literatura, de modo que alguns estudos demonstraram uma maior ocorrência de norovírus no inverno (PHAN et al., 2004, FRETZ et al., 2005), enquanto outros descreveram um aumento importante da frequência destas infecções nos meses de primavera e verão (MARSHALL et al., 2003; PARASHAR et al., 2004). Portanto, nossos resultados apontam e reiteram a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre este aspecto, pois até o momento, o perfil sazonal não foi estabelecido.

Na literatura está amplamente documentado que as infecções por norovírus acometem indivíduos de todas faixas etárias (FANKHAUSER et al., 2002; PATEL et al., 2009). Neste estudo, a presença de norovírus foi pesquisada em indivíduos de 0 a 12 anos e os resultados mostraram que as infecções por estes vírus não foram detectadas em todos os grupos etários analisados. Nos dois anos de investigação, todas as amostras positivas foram detectadas em crianças com até 36 meses, com apenas uma exceção, que consistiu na detecção positiva, em espécime fecal proveniente de uma criança de 12 anos.

A expressiva ocorrência das infecções na faixa etária de 0 a 36 meses como foi observada, ratifica alguns estudos já realizados no mundo e em outras regiões do Brasil, reiterando assim o expressivo papel destes vírus em infecções entéricas, que acometem principalmente crianças mais jovens (PHAN et al., 2004; CASTILHO et al., 2006; SOARES et al., 2007). Em levantamento realizado na cidade do Rio de Janeiro, em 2004, foi observado que as infecções por norovírus acometeram, principalmente, crianças de 0 a 12 meses (VICTORIA et al., 2007). Outro estudo realizado no mesmo estado, durante os anos de 2005 a 2008, relatou que 36,5% (226/616) dos casos positivos para norovírus, entre pacientes hospitalizados ou não, ocorreram em crianças de até 24 meses (FERREIRA et al., 2010).

A maior concentração de casos positivos entre crianças mais jovens, como tem sido demonstrado na literatura, pode ser resultante de uma exposição precoce ao agente, aliada à deficiência de uma imunidade protetora ativa nos primeiros meses de vida, como já demonstrado por TALAL et al. (2000) e DAI et al. (2004), devendo-se considerar, ainda, a grande diversidade genética e antigênica destes vírus, que podem causar reinfecções ao longo da vida (PARKS et al., 1999; DONALDSON et al., 2010).

Em relação à influência da variável sexo, a análise estatística aplicada aos dados obtidos neste estudo confirmou, mais uma vez, achados descritos por outros pesquisadores (FRETZ et al., 2005, VICTORIA et al., 2007), de que esta variável, não influi sobre a ocorrência da infecção.

Todas as amostras positivas detectadas neste estudo foram classificadas quanto ao genogrupo. Inicialmente, foi utilizada a metodologia

de PCR descrita por Vinjé et al. (2004), visto que o produto obtido, além de classificar quanto ao genogrupo, permite ainda sua utilização na reação subsequente de sequenciamento, para a determinação do genótipo da amostra. Entretanto, não foi possível genogrupar todas as amostras submetidas a este protocolo, mesmo depois de repetidas tentativas. Assim, os genogrupos destas amostras foram definidos, utilizando-se alternativamente, o protocolo da PCR descrito por Fankhauser et al.(2002). No entanto, embora eficaz para essa caracterização quanto ao genogrupo, o produto obtido nesta PCR já foi descrito, por alguns pesquisadores, como não adequado para a determinação dos genótipos virais (FANKHAUSER et al.; 2002; ZHENG et al., 2006; XAVIER et al., 2009). Situação semelhante à encontrada neste estudo foi relatada por Ferreira et al. (2010), que relataram amostras positivas quando utilizaram a PCR para a região B (ORF1), mas que foram negativas quando analisada pela PCR dirigida para a região D (ORF2), sugerindo assim, que esta última região seja menos sensível à detecção. Como a região D (ORF2) codifica para a proteína VP1, presente na porção mais externa da partícula viral e, portanto, mais sujeita à pressão seletiva, é possível que as alterações genéticas, por mutação ou eventos de recombinação do genoma viral ocorridos nesta região (ZHENG et al., 2006; MATTISON et al., 2009), acarretem em falhas na hibridização com os oligonucleotídeos utilizados. Outra possibilidade levantada é que haja a formação de estrutura secundária na molécula do RNA viral, o que afetaria a eficiência da amplificação (AMBERT-BALAY et al., 2005; TSUGAWA et al.,2006; ZHENG et al., 2006; MATTISON et al., 2009).

A caracterização molecular das amostras de norovírus detectadas em Juiz de Fora, confirmou a presença de amostras pertencentes aos genogrupos I e II, com uma predominância marcante de NoV GII. Este resultado corrobora o que foi observado por diversos outros pesquisadores, que apontaram uma circulação expressiva de amostras NoV GII em relação às NoV GI (LOPMAN, BROWN e KOOPMANS, 2002; ZINTZ *et al.*, 2005; PATEL et al., 2008; FERREIRA et al., 2010). Uma única amostra NoV GI foi detectada, entretanto, não foi possível realizar reações posteriores confirmatórias e de genotipagem, devido à escassez do espécime fecal, para a conclusão das análises.

O sequenciamento parcial do genoma, a partir do produto da PCR da região D, tem sido uma metodologia utilizada tanto na identificação de genótipos como em estudos de epidemiologia molecular e, mais recentemente, como ferramenta para avaliação da emergência de variantes de norovírus (MATTISON et al., 2009; BARREIRA et al., 2010).

O sequenciamento e a análise filogenética das amostras de norovírus caracterizadas como GII revelou a presença dos genótipos GII.4 e GII.6 durante os dois anos de estudo, reiterando, portanto, a circulação dos mesmos, também no estado de Minas Gerais, assim como tem sido observado em outros estados brasileiros (CASTILHO et al., 2006; MORRILLO et al., 2008; NAKAGOMI et al., 2008; BARREIRA et al., 2010; FERREIRA et al., 2010).

Das 20 amostras detectadas ao longo dos dois anos de estudo, 11 foram sequenciadas e, dentre estas, somente os genótipos GII.4 e GII.6 foram detectados. Assim, os resultados obtidos evidenciaram a presença e circulação destes genótipos, associados a casos esporádicos de doença diarreica aguda infantil, em Juiz de Fora. No entanto, vários estudos realizados em diferentes países, inclusive no Brasil, observaram a circulação de diferentes genótipos deste vírus em um mesmo período e espaço geográfico, relatando uma relevante diversidade genética, não apenas entre as amostras de norovírus associadas a casos esporádicos, mas também entre aquelas associadas a surtos da doença (KIRKWOOD et al., 2005; CASTILHO et al., 2006; CAMPOS et al., 2008; YOON et al., 2008; BARREIRA et al., 2010; FERREIRA et al., 2010.). Desse modo, é possível que a pequena diversidade genética, encontrada neste estudo, possa estar associada ao pequeno número de amostras sequenciadas.

Na literatura, tanto nacional quanto internacional, está amplamente documentado que as amostras NoV GII.4 são as mais comumente encontradas, com expressiva taxa de detecção, superior às de genótipo GII.6 (YOON et al., 2008, PATEL et al., 2009; XAVIER et al., 2009, BARREIRA et al., 2010, FERREIRA et al., 2010). Num estudo epidemiológico de vigilância das infecções por norovírus, realizado no estado do Rio de Janeiro no período 2005-2008, apenas no ano de 2007 foi relatada a detecção de amostras NoV GII.6 (FERREIRA et al., 2010), ao passo que Barreira et al. (2010), em estudo

realizado no Espírito Santo, descreveu-o como o terceiro genótipo mais detectado. Dentro dos limites da pesquisa, nossos resultados mostraram que amostras NoV GII.6 circularam nos dois anos de estudo, tendo sido detectadas com frequência semelhante às amostras GII.4, diferentemente do que tem sido relatado em outros estudos semelhantes, realizados no país.

A análise comparativa das sequências das amostras de NoV GII.4, circulantes em Juiz de Fora no ano de 2008, permitiu observar que elas apresentaram maior similaridade de nucleotídeos e de aminoácidos com amostras que circularam no estado do Rio de Janeiro nos anos de 2006, 2007 e 2008, sendo que, JF-247 e JF-709 apresentaram similaridade nucleotídica que variou de 98,8% a 100% com amostras do estado do Rio de Janeiro que circularam nos anos de 2007 e 2008.

As divergências de 12,6% e 4,2% nas sequências de nucleotídeos encontradas entre as amostras NoV GII.4 e GII.6, respectivamente, foram inferiores àquelas relatadas por estudo semelhante, realizado por Barreira et al. (2010), no qual foram descritas taxas de 20,6% e 18,7%, respectivamente, para estes mesmos genótipos. Desse modo, uma menor divergência entre as amostras de norovírus detectadas em Juiz de Fora, nos dois anos subsequentes (2008 e 2009), sobretudo, entre as NoV GII.6, sugere uma homogeneidade entre elas.

Adicionalmente, a análise filogenética demonstrou que amostras NoV GII.6, detectadas em Juiz de Fora, foram mais proximamente relacionadas com uma amostra NoV GII.6 (GU132461/2007) que circulou no estado do Rio de Janeiro em 2007, fato que, aliado à proximidade geográfica das duas cidades em que foram detectadas e à grande similaridade de nucleotídeos e aminoácidos observada entre elas, sugere uma possível linhagem comum entre as mesmas.

Este é o primeiro estudo epidemiológico realizado em Juiz de Fora, visando à detecção dos norovírus e à pesquisa dos genótipos circulantes, associados a casos de doença diarreica aguda infantil, sendo pioneiro, também, no estado de Minas Gerais. Dessa forma, nossos dados se somam aos achados de outras pesquisas realizadas, ampliando o conhecimento e contribuindo para um maior entendimento das infecções e dos norovírus que circulam em nosso meio.

Diante da relevância epidemiológica das doenças diarreicas agudas, sobretudo pelas consequências associadas quando acometem crianças de pouca idade, é importante realizar o diagnóstico preciso destas infecções, não apenas para reduzir o impacto na sociedade, mas também para que as medidas profiláticas e de controle da disseminação da doença possam ser conhecidas e executadas efetivamente.

7. CONCLUSÕES

- O presente trabalho permitiu constatar a presença e a circulação dos norovírus em população infantil da cidade de Juiz de Fora, confirmando sua importante participação como agente etiológico nas diarreias agudas infantis.
- A prevalência de NoV no período 2008-2009 foi de 9,17%, mostrando que, embora pouco estudados, estes vírus estão envolvidos em casos esporádicos de doença diarréica aguda infantil, ocorridos também em Juiz de Fora, MG.
- Neste estudo observou-se uma tendência de sazonalidade das infecções no ano de 2008, no período da estação seca, fato que não se repetiu em 2009, quando os norovírus foram detectados em vários meses do ano, durante as estações seca e úmida. Entretanto, a análise comparativa da distribuição mensal das amostras positivas, detectadas nos dois anos, mostrou uma tendência na ocorrência das infecções, nos meses de maio e julho.
- A maioria das amostras positivas, deste levantamento, foi detectada em crianças na faixa etária de 0 a 36 meses.
- Não foi observada influência do sexo da criança, na ocorrência das infecções pelos norovírus.
- A caracterização molecular das amostras detectadas em Juiz de Fora mostrou a presença dos NoV GI e GII, evidenciando a predominância de NoV GII, assim como vem sendo relatado em diversos estudos epidemiológicos realizados ao redor do mundo.

- O sequenciamento e análise filogenética de algumas das amostras NoV GII revelou a presença de genótipos GII.4 e GII.6, que co-circularam nos anos de 2008 e 2009.

- As amostras JF-247, JF-705 e JF-709 de NoV GII.4, que circularam no ano de 2008, apresentaram maior similaridade nucleotídica e de aminoácidos com amostras que circularam no estado do Rio de Janeiro, nos anos de 2006, 2007 e 2008.

- A análise filogenética mostrou que as amostras NoV GII.6, detectadas em Juiz de Fora, foram mais proximamente relacionadas com uma amostra GII.6 (GU132461/2007), que circulou no estado do Rio de Janeiro, em 2007. Este fato aliado à alta similaridade de nucleotídeos e aminoácidos entre estas amostras e a proximidade geográfica das cidades em que foram detectadas, sugere uma possível linhagem comum entre as mesmas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, J. L.; ZICKL, R. 1969. Winter vomiting disease. **The Journal of Infectious Diseases**, **119**: 668-673.

AGUS, S.; DOLIN, R.; WYATT, R.; TOUSIMIS, A.; NORTHRUP, R. 1973. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. **Annals of Internal Medicine**, **79**: 18-25.

AMAR, C. F.; EAST, C. L.; GRAY, J.; ITURRIZA-GOMARA, M.; MACLURE, E. A.; MCLAUCHLIN, J. 2007. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English casecontrol Infectious Intestinal Disease Study (1993–1996). **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, **26**: 311–23.

AMBERT-BALAY, K., BON, F.; LE GUYADER, F.; POTHIER, P.; KOHLI, E. 2005. Characterization of new recombinant noroviruses. **Journal of Clinical Microbiology** **43**: 5179–5186.

ANDO, T.; JIN, Q.; GENTSCH, J. R. 1995. Epidemiologic applications of novel molecular methods to detect and differentiate small round structured viruses (Norwalk-like). **Journal of Medical Virology**, **47**: 145-152.

ANDREASI, M. S. A.; BATISTA S. M. F.; TOZETTI, A.; OZAKI, C. O.; NOGUEIRA, M. M, FIACCADORI, F. S, BORGES A. M. T; SANTOS, R. A. T; CARDOSO, D. D. P. 2007. Rotavírus A em crianças de até três anos de idade, hospitalizadas com gastroenterite aguda em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **40**: 411-414.

ARIAS, C.; SALA, M.R.; DOMÍNGUEZ, A.; TORNER, N.; RUIÍZ, L.; MARTÍNEZ, A.; BARTOLOMÉ, R., DE SIMÓN, M.; BUESA, J. 2010. Epidemiological and clinical features of norovirus gastroenteritis in outbreaks: A population-based study. **Clinical Microbiology and Infection**, **16**: 39–44.

ATMAR, R. L.; ESTES, M. K. 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the Human Caliciviruses. **Clinical Microbiology Reviews**, **14**: 15-37.

BARREIRA, D. M; FERREIRA, M. S; FUMIAN, T. M; CHECON, R; DE SADOVSKY, A. D; LEITE, J. P; MIAGOSTOVICH, M. P; SPANO, L. C. 2010. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. **Journal of Clinical Virology**, **47**: 60-4.

BERECIARTU, A.; BOK, K; GÓMEZ, J. 2002. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. **Journal of Clinical Virology**, **25**: 197-203.

BLACK, R. E; COUSENS, S; JOHNSON, H. L; LAWN, J. E; RUDAN, I; BASSANI, D. G; JHA, P; CAMPBELL, H; WALKER, C. F; CIBULSKIS, R; EISELE, T; LIU, L; MATHERS, C; CHILD HEALTH EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP OF WHO AND UNICEF. 2010. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**; **375**: 1969–87.

BLACKLOW, N. R.; CUKOR, G.; BEDIGIAN, M.K.; ECHEVERRIA, P.; GREENBERG, H.B.; SCHREIBER, D.S. 1979. Immune response and prevalence of antibody to Norwalk enteritis virus as determined by radioimmunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, **10**: 903-909.

BON, F.; AMBERT-BALAY, K.; GIRAUDON, H.; KAPLON, J.; LE GUYADER, S.; POMMEPUY, M.; GALLAY, A.; VAILLANT, V.; DE VALK, H.; CHIKHI-BRACHET, R.; FLAHAUT, A.; POTHIER, P.; KOHLI, E. 2005. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004 . **Journal of Clinical Microbiology**, **43**: 4659-4664.

BON, F.; FASCIA, P.; DAUVERGNE, M.; TENENBAUM, D.; PLANSON, H.; PETION, A. M.; POTHIER, P.; KOHLI, E. 1999. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. **Journal of Clinical Microbiology**, **37**: 3055–8.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLENP, P.M.E.; Noordaam, J.V.D. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. 1990. **Journal of Clinical Microbiology**, **28** : 495-503.

BORGES, A.M.; TEIXEIRA, J.M.; COSTA, P.S.; GIUGLIANO, L.G.; FIACCADORI, F.S.; FRANCO, R.C.; BRITO, W.M.; LEITE, J.P.G.;

CARDOSO, D.D. 2006. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **10**:721-724.

BRYCE, J.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; BLACK, R.E; THE WHO CHILD HEALTH EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP. 2005. WHO estimates of the causes of death in children. **The Lancet** , **365**:1147-1152.

BRUINS, M.J.; WOLFHAGEN, M.J.; SCHIRM, J.; RUIJS, G. J. 2010. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of norovirus in stool samples. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, **29 (6)**: 741-3.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de informação sobre mortalidade: Mortalidade hospitalar do SUS MS/SUS/DASIS 2009. Brasília, 2009. Disponível em: <http://%3chttp//tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2008/c06.def>> Acessado em 9 Janeiro 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação Hospitalar: Morbidade Hospitalar do SUS. Brasília, 2009a. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/nimg.def>>. Acesso em: 15 fev. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação sobre Mortalidade: Mortalidade Hospitalar do SUS MS/SUS/DASIS 2009. Brasília, 2009b. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2008/c06.def>>. Acesso em 15 fev. 2010.

BULL, R.; HANSMAN,G.; CLANCY, L.; TANAKA, M.; RAWLINSON, W.; WHITE, P. 2005. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerging Infectious Diseases Journal*, **11**: 1079-1085.

CAMPOS, G.S.; MOREAU, V.H.; BANDEIRA, A.; BARBERINO, G.; ALMEIDA, P.F.; AMADOR, D.M.; DE LIMA, M.O.; SARDI, S.I. 2008. Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil . **Archives of Virology**, **153 (6)**: 1125-9.

CARDOSO, D.D.P e BORGES, A.M.T. 2005. Calicivírus Humanos. **Revista de Patologia Tropical**, **34**: 17-26.

CASTILHO, J.G.; MUNFORD, V.; RESQUE,H.R.; FAGUNDES-NETO, U.; VINJÉ, J.; RÁCZ, M.L. 2006. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo state, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**: 3947-3953.

CDC. 2005. Norovirus outbreak among evacuees from hurricane Katrina – Houston, Texas, September 2005. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, **54 (40)**: 1016-1018.

CHOI, J., HUTSON, A , ESTES, M, PRASAD, B. 2008. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **27**: 9175–9180.

COLOMBA, C.; SAPORITO, L.; GIAMMANCO, G. M.; DE GRAZIA, S.; RAMIREZ, S.; ARISTA, S.; TITONE, L. 2007. Norovirus and gastroenteritis in hospitalized children, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, **13**: 1389–91.

CVE/SES-SP.CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA SECRETÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em: www.cve.saude.sp.gov.br/.

DAI, Y. C.; NIE, J.; ZHANG, X. F.; LI, Z. F.; BAI, Y.; ZENG, Z.R.; YU, S.Y.; FARKAS, T.; JIANG, X. 2004. Seroprevalence of antibodies against noroviruses among students in a Chinese military medical university. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**: 4615–9.

DE BRUIN, E.; DUIZER, E.; VENNEMA, H.; KOOPMANS, M. P. 2006. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. **The Journal of Virological Methods**, **137**: 259-264.

DEWAAL, C.S.; BHUIYA, F. Outbreaks by the numbers: fruits and vegetables. In: **Presented at the International Association for Food Protection 94th Annual Meeting. 2007** [Abstract available at: <http://www.foodprotection.org/meetings.Education/IAFP%202007/Poster%20Abstracts.pdf>].

DE WIT, M. A.; KOOPMANS, M. P.; KORTBEEK, L. M.; VAN LEEUWEN, N. J.; BARTELD, A.I.; VAN-DUYNHOVEN, Y. T. 2001. Gastroenteritis in sentinel general practices, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases Journal** , **7**: 82–91.

DINGLE, K.E.; LAMBDEN, P.R.; CAUL, E.O.; CLARKE, I.N. 1995. Human enteric Caliciviridae: The complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. **Journal of General Virology**, **76**: 2349-2355.

D'SOUZA, D.H.; SAIR, A.; WILLIAMS, K.; PAPAFRAGKOU, E.; JEAN, J.; MOORE, C.; JAYKUS, L. 2006. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. **International Journal of Food Microbiology**, **108 (1)**: 84-91.

DOLIN, R.; BLACKLOW, N.; DUPONT, H.; FORMAL, S.; BUSCHO, R.; KASEL, J.; CHAMES, R.; HORNICK, R.; CHANOCK, R. 1971. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. **The Journal of Infectious Diseases**, **123**: 307-312.

DONALDSON, E.F.; LINDESMITH, L.C.; LOBUE, A.D.; BARIC, R.S. 2010. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system, **Nature Reviews Microbiology**. **8 (3)**: 231-41.

EDGE, V. L.; POLLARI, F., NG, L. K.; MICHEL, P.; MCEWEN, S. A.; WILSON, J. B.; JERRETT, M.; SOCKETT, P. N.; MARTIN, S. W. 2006. Syndromic Surveillance of Norovirus using Over-the-counter Sales of Medications Related to Gastrointestinal Illness. **Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology**, **17**: 235-41.

FAÇANHA, M.C.; PINHEIRO, A.C. 2005. Comportamento das doenças diarreicas agudas em serviços de saúde de Fortaleza, Ceará, Brasil, entre 1996 e 2001. **Cadernos de saúde pública**, **21**: 49-54.

FANKHAUSER, R.L.; MONROE, S.S., NOEL, J.S.; HUMPHREY, C.D.; BRESEE, J.S.; PARASHAR, U.D. 2002. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, **186 (1)**: 1-7.

FERNÁNDEZ, J., DE OÑA, M.; MELÓN, S.; ALVAREZ-ARGÜELLES, M. E.; BOGA, J. A. 2010. Noroviruses as cause of gastroenteritis in elderly patients. **Aging Clinical and Experimental Research**, May 11.

FERREIRA, M.S.; XAVIER, M.P.; FUMIAN, T.M.; VICTORIA, M.; OLIVEIRA, S.A.; PENA, L.H.; LEITE, J.P.; MIAGOSTOVICH, M.P. 2008. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. **Journal of Medical Virology**, **80 (2)**: 338-44.

FERREIRA, M. S.; VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F.A.; VIEIRA, C.B.; XAVIER, M.P.; FIORETTI, J.M.; ANDRADE, J.; VOLOTÃO, E. M, ROCHA, M.; LEITE, J. P.; MIAGOSTOVICH, M. P. 2010. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio De Janeiro, Brazil 2005-2008. **Journal of Medical Virology**, **82**: 1442–1448.

FRETZ, R.; HERRMANN, L.; CHRISTEN, A.; SVOBODA, P.; DUBUIS, O.; VIOLLIER, E. H.; TANNER, M.; BAUMGARTNER, A. 2005. Frequency of Norovirus in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms in Switzerland. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, **24**: 214 – 216.

FROGGATT P.C., BARRY-VIPOND, I.; ASHLEY, C.R.; LAMBDEN, P.R.; CLARKE, I.N.; CAUL, E.O. 2004. Surveillance of norovirus infection in a study of sporadic childhood gastroenteritis in South West England and South Wales, during one winter season (1999-2000). **Journal of Medical Virology**, **72**: 307-311.

FUMIAN, T.M.; LEITE, J.P.; MARIN, V.A.; MIAGOSTOVICH, M.P. 2009. Rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. **Journal of Virological Methods**, **155 (1)**: 39-43.

GABBAY, Y.B.; GLASS, R.I.; MONROE, S.S.; CARCAMO, C.; ESTES, M.K.; MASCARENHAS, J.D.; LINHARES, A.C. 1994. Prevalence of antibodies to Norwalk virus among Amerindians in isolated Amazonian communities. **American Journal of Epidemiology**, **139 (7)**: 728-33.

GALLIMORE, C.I.; BARREIROS, M.A.B.; BROWN, D.W.G.; NASCIMENTO J.P.; LEITE, J.P.G. 2004. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **37**: 321-326.

GEORGIADIS, S.; PILGER, D. A.; PEREIRA, F.; CANTARELLI, V.V.; 2010. Molecular evaluation of norovirus in patients with acute gastroenteritis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **43**: 277-80.

GORDON, I.; INGRAHAM, H. S.; KORNS, R. F. 1947. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. **The Journal of Experimental Medicine**, **86**: 409-422.

GREEN, J.; GALLIMORE, C.I.; NORCOTT, J.P. 1995. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. **Journal of Medical Virology**, **47**: 392-398.

GREEN K. Y. Caliciviridae: The Noroviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M (Eds.). *Fields in Virology*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 5th (ed.), 1: 949-979, 2007.

GREENBERG, H.B.; VALDESUSO, J.R.; KALICA, A.R.; WYATT, R.G.; McAULIFFE, V.J.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. 1981. Proteins of Norwalk virus. **Journal of Virology**, **37**: 994-999.

GUO, M.; HAYES, J.; CHO, K.; PARWANI, A.; LUCAS, L.; SAIF, L. 2001. Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. **The Journal of Virology**, **75**: 9239-9251.

GUO, L.; SONG, J.; X. U, X.; REN, L.; L. I, J.; ZHOU, H.; WANG, M.; Q. U, J.; WANG, J.; HUNG, T. 2009. Genetic analysis of norovirus in children affected with acute gastroenteritis in Beijing, 2004-2007. **Journal of Clinical Virology**, **44 (1)**: 94-98.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**; **41**: 95-98.

HANSMAN, G. S.; DOAN, L.T.; KGUYEN, T. A.; OKITSU, S.; KATAYAMA, K.; OGAWA, S.; NATORI, K.; TAKEDA, N.; KATO, Y.; NISHIO, O.; NODA,

M.; USHIJIMA, H. 2004a. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. **Archives of Virology**, **149**: 1673–88.

HARDY M. E. 2005. Norovirus protein structure and function. **FEMS Microbiology Letters**, **253 (1)**: 1-8.

HERRMANN, J.E.; BLACKLOW, N.R.; MATSUI, S.M.; LEWIS, T.L.; ESTES, M.K.; BALL, J.M.; BRINKER, J.P. 1995. Monoclonal antibodies for detection of Norwalk virus antigen in stools. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**: 2511-2513.

HIGGINS, A.R. 1956. The case for viral diarrheal disease. **American Journal of Medicine**, **21**: 157–160.

HOHNE, M.; SCHREIER, E. 2004. Detection and characterization of norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system. **Journal of Medical Virology**, **72**: 312–319.

HUANG, X.; MILLER, W. 1991. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. **Advances in Applied Mathematics**, **12** : 337-357.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Demográfico 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/censo2010/>. Acesso em: 29 de dezembro de 2010.

ICTV 2009. Virus Taxonomy: 2009 Release. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>. Acesso em: 19 de janeiro de 2010.

JIANG, X; WANG, K. N.; GRAHAM, D. Y.; ESTES, M. 1992a. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. **The Journal of Virology**, **66**: 6527-32.

JIANG, X; WANG, K. N.; GRAHAM, D. Y.; ESTES, M. 1992b. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, **30**: 2529-2534.

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

JIANG, X.; ESPUL, C.; ZHONG, W. M.; CUELLO, H.; MATSON, D. O. 1999. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. **Archives of Virology**, **144**: 2377-2387.

JIANG, X.; WILTON, N.; ZHONG, W.M.; FARKAS, T.; HUANG, P.W.; BARRETT, E. 2000. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. **The Journal of Infectious Diseases**, **181**: 349-359.

KAGEYAMA, T.; KOJIMA, S.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; FUKUSHI, S.; HOSHINO, F.; TAKEDA, N.; KATAYAMA, K. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**: 1548-1557.

KAMEL, A. H.; ALI, M. A.; EL-NADY, H. G.; DE ROUGEMONT, A.; POTHIER, P.; BELLIOU, G. 2009. Predominance and Circulation of Enteric Viruses in Grand Cairo. **Journal of Clinical Microbiology**, **47**: 1037-45.

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

KAPIKIAN, A.Z.; GERIN, J.L.; WYATT, R.G.; THORNHILL, T.S.; CHANOCK, R.M. 1973. Density in cesium chloride of the 27 nm "8FIIa" particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis: determination by ultracentrifugation and immune electron microscopy. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** **142**: 874-7.

KAUFMAN, S. S.; CHATTERJEE, N. K.; FUSCHINO, M. E.; MAGID, M. S.; GORDON, R. E.; MORSE, D. L.; HEROLD, B. C.; LELEIKO, N. S.; TSCHERNIA, A.; FLORMAN, S. S.; GONDOLESI, G. E.; FISHBEIN, T. M. 2003. Calicivirus enteritis in an intestinal transplant recipient. **American Journal of Transplantation**, **3**: 764-8.

KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N.; PEERAKOME, S.; TONUSIN, S.; MALASAO, R.; MIZUGUCHI, M.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. 2007. Genetic

diversity of noroviruses and sapoviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. **Journal of Medical Virology**, **79**: 1921–6.

KHAN, M. A.; BASS, D. M. 2010. Viral infections: new and emerging. **Current Opinion in Gastroenterology**, **26**: 26-30.

KIMURA, M .1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, **16**: 111-120.

KIRKWOOD, C. D.; CLARK, R.; BOGDANOVIC-SAKRAN, N.; BISHOP, A.O. R. F. 2005. A 5-year Study of the Prevalence and Genetic Diversity of Human Caliciviruses Associated with Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Young Children Admitted to Hospital in Melbourne, Australia (1998–2002). **Journal of Medical Virology**, **77**: 96–101.

KOJIMA, S.; KAGEYAMA, T.; FUKUSHI, S.; HOSHINO, F.B.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; NATORI, K.; TAKEDA, N.; KATAYAMA, K. 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *The Journal of Virological Methods*, **100**: 107-14.

KOOPMANS M. 2009. Noroviruses in healthcare settings: a challenging problem. **Journal of Hospital Infection**, **73**: 331-337.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L 2003. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bulletin of the World Health Organization**, **81**:197-204.

LAU, C. S.; WONG, D. A.; TONG, L. K.; LO, J. Y.; MA, A. M.; CHENG, P. K.; LIM, W. W. 2004. High rate and changing molecular epidemiology pattern of norovirus infections in sporadic cases and outbreaks of gastroenteritis in Hong Kong. **Journal of Medical Virology**, **73**: 113–7.

LE GUYADER, F.; ESTES, M.K.; HARDY, M.E.; NEILL, F.H.; GREEN, J.; BROWN, D.W.; ATMAR, R.L. 1996. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. **Archives of Virology**, **141 (11)**: 2225-35.

LINDESMITH, L.; MOE, C.; LEPENDU, J.; FRELINGER, J. A.; TREANOR, J.; BARIC, R. S. 2005. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. **The Journal of Virology** **79**: 2900-2909.

LOPMAN, B. A.; VENNEMA, H.; KOHLI, E.; POTHIER, P.; SANCHEZ, A.; NEGREDO, A.; BUESA, J.; SCHEREIER, E.; REACHER, M.; BROWN, D.; GRAY, J.; ITURRIZA, M.; GALLIMORE, C.; BOTTIGER, B.; HEDLUND, K.; TORVÉN, M.; BONSDORFF, C.; MAUNULA, L.; POLJSK-PRIJATELJ, M.; ZIMSEK, J.; REUTER, G.; SZÜCS, G.; MELEGH, B.; SVENNSON, L.; DUIJNHOF, Y.; KOOPMANS, M. 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. **The Lancet**, **363**: 682-87.

LOPMAN, B. A.; BROWN, D. W.; KOOPMANS, M. 2002. Human calicivirus in Europe. **Journal of Clinical Virology**, **24**: 137-160.

LOPMAN, B.A.; REACHER, M.H.; VIPOND, I.B.; SARANGI, J.; BROWN, D.W. 2004. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. **Clinical Infectious Diseases**; **39**: 318-24.

MADELEY, C.R.; COSGROVE, B.P. 1976. Letter: Caliciviruses in man. **The Lancet.**, **24** : 199-200.

MARSHALL, J. A.; HELLARD, M. E.; SINCLAIR, M.I.; FAIRLEY, C.K.; COX, B. J.; CATTON, M. G.; KELLY, H.; WRIGHT, P. J. 2003. Incidence and characteristics of endemic Norwalk-like virus-associated gastroenteritis. **Journal of Medical Virology**, **70** : 336.

MATTISON, K, SEBUNYA, T. K.; SHUKLA, A.; NOLIWE, L. N.; BIDAWID, S. 2010. Molecular detection and characterization of noroviruses from children in Botswana. **Journal of Medical Virology**, **82**: 321-324.

MATTISON, K., GRUDESKI, E.; AUK, B.; CHAREST, H. DREWS, S. J.; FRITZINGER, A.; GREGORICUS, N.; HAYWARD, S.; HOUDE, A.; LEE, B. E.; PANG, X. L.; WONG, J.; BOOTH, T. F.; VINJÉ, J. 2009. Multicenter comparison of two norovirus ORF2-based genotyping protocols. **Journal of Clinical Microbiology**, **47**: 3927-32.

MATTNER, F.; SOHR, D.; HEIM, A.; GASTMEIER, P.; VENNEMA, H.; KOOPMANS, M. 2006. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. **Clinical Microbiology and Infection**, **12**: 69–74.

MIAGOSTOVICHI, M. P.; FERREIRA, F. F.; GUIMARÃES, F. R.; FUMIAN, T. M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S. L.; SILVA, L. A.; LEITE, J. P. 2008. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazonia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, **74**: 375-82.

MONICA, B.; RAMANI, S.; BANERJEE, I.; PRIMROSE, B.; ITURRIZA-GOMARA, M.; GALLIMORE, C. I.; BROWN, D. W.; M. F.; MOSES, P. D.; GRAY, J. J.; KANG, G. 2007. Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India. **Journal of Medical Virology**, **79**: 544–551.

MOYO, S.J.; GRO, N.; KIRSTI, V.; MATEE, M. I.; KITUNDU, J.; MASELLE, S. Y.; LANGELAND, N.; MYRMEL, H. 2007. Prevalence of enteropathogenic viruses and molecular characterization of group A rotavirus among children with diarrhea in Dar es Salaam Tanzania. **BMC Public Health**, **27**:359.

MORILLO, S. G.; CILLI, A.; CARMONA, R. C. C.; TIMENETSKY, M. C. S. T. 2008. Identification and molecular characterization of norovirus in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** **39**: 619-622.

MURATA, T.; KATSUSHIMA, N.; MIZUTA, K.; MURAKI, Y.; HONGO, S.; MATSUZAKI, Y. 2007. Prolonged norovirus shedding in infants _6 months of age with gastroenteritis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, **26**: 46–49.

NAKAGOMI, T.; CORREIA, J.B.; NAKAGOMI, O.; MONTENEGRO, F.M.; CUEVAS, L.E.; CUNLIFFE, N.A.; HART, C.A. 2008. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. **Archives Virology**, **153(5)**: 957-60.

NOEL, J.S.; ANDO, T.; LEITE, J.P.; GREEN, K.Y.; DINGLE, K.E.; ESTES, M.K.; SETO, Y.; MONROE, S.S.; GLASS, R.I. 1997. Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured

viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. **Journal of Medical Virology** , **53**: 372-83.

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

ONISHI, N.; HOSOYA, M.; MATSUMOTO, A.; IMAMURA, T.; KATAYOSE, M.; KAWASAKI, Y.; HASHIMOTO, O.; HAYASHI , A.; ISHIKO, H.; SUZUKI, H. 2008. Molecular epidemiology of norovirus gastroenteritis in Soma, Japan, 2001 – 2003. **Pediatrics International** , **50**: 65–69.

O'NEILL, H. J.; MCCAUGHEY. C.; WYATT. D. E.; MITCHELL. F.; COYLE, P. V. 2001. Gastroenteritis outbreaks associated with Norwalk-like viruses and their investigation by nested RT-PCR . **BMC Microbiology**. **1**: 14.

O'RYAN, M.L.; VIAL, P.A.; MAMANI, N.; JIANG, X.; ESTES, M.K.; FERRECIO, C.; LAKKIS, H.; MATSON, D.O. 1998. Seroprevalence of Norwalk virus and Mexico virus in Chilean individuals: assessment of independent risk factors for antibody acquisition. **Clinical Infectious Diseases** , **27**: 789-795.

O'RYAN, M.; SALINAS, A. M.; MAMANI, N.; MATSON, D.O.; JIANG, X.; VIAL, P. 1999. Detection of Norwalk and Mexico viruses, two human caliciviruses in stools of Chilean children. **Revista Medica de Chile** , **127**: 523-531.

O' RYAN, M. L.; MAMANI, N.; GAGGERO, A.; AVENDANO, L. F.; PRIETO, S.; PENA, A.; JIANG, X.; MATSON, D. O. 2000. Human caliciviruses are a significant pathogen of acute sporadic diarrhea in children of Santiago, Chile. **The Journal of Infectious Diseases** , **182**: 1519-1522.

PANG, X. L.; JOENSUU, J.; VESIKARI, T. 1999. Human calicivirus-associated sporadic gastroenteritis in Finnish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. **The Pediatric Infectious Disease Journal** , **18**: 420–426.

PAPAVENTSIS, D. C.; DOVE, W.; CUNLIFFE, N.; NAKAGOMI, O.; COMBE, P.; GROSJEAN, P.; HART, C.A. 2007. Norovirus infection in children with acute gastroenteritis, Madagascar, 2004–2005. **Emerging Infectious Diseases Journal** , **13**: 908–11.

PARKS, C.G.; MOE, C.L.; RHODES, D.; LIMA, A.; BARRETT, L.; TSENG, F.; BARIC, R.; TALAL, A.; GUERRANT, R. 1999. Genomic diversity of "Norwalk like viruses" (NLVs): pediatric infections in a Brazilian shantytown. **Journal of Medical Virology**, **58**: 426-434.

PATEL, M. M.; WIDDOWSON, M. A.; GLASS, R. I.; AKAZAWA, K.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U. D. 2008. Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. **Emerging Infectious Diseases**, **14(8)**: 1224–1231.

PATEL, M. M.; HALL, A. J.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U. D. 2009. Noroviruses: A comprehensive review. **Journal of Clinical Virology**, **44**: 1–8.

PHAM, N. T.; TRINH, Q.D.; CHAN-IT, W.; KHAMRIN, P.; SHIMIZU, H.; OKITSU, S.; MIZUGUCHI, M.; USHIJIMA, H. A. 2010. novel RT-multiplex PCR for detection of Aichi virus, human parechovirus, enteroviruses, and human bocavirus among infants and children with acute gastroenteritis. **The Journal of Virological Methods**, **169**: 193-7.

PHAN, T. G.; OKAME, M.; NGUYEN, T. A.; MANEEKARN, N.; NISHIO, O.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. 2004. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. **Journal of Medical Virology** , **73**: 256-261.

ROCHA, MONICA COUTO GUEDES SEJANES. Diarreia aguda em crianças hospitalizadas no município de Juiz de Fora – Minas Gerais: Prevalência e fatores de risco associados à gravidade da doença. 2010. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde, área de Concentração em Saúde Brasileira) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

PARASHAR, U. D.; LI, J.F.; CAMA, R.; DEZALIA, M.; MONROE, S.S.; TAYLOR, D.N.; FIGUEROA, D.; GILMAN, R.H.; GLASS, R.I. 2004. Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. **The Journal of Infectious Diseases**, **190**: 1088-1092.

PARASHAR, U.D.; GIBSON, C. J.; BRESEE, J. S.; GLASS, R. I. 2006. Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. **Emerging Infectious Diseases Journal** , **12**: 304-306.

PRADO, T.; SILVA, M.; GUILAYN, W.C.; ROSE, T.L.; GASPAR, A.M.; MIAGOSTOVICH, M.P. 2011. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. **Water Research**, **45 (3)**:1287-97.

PUJOL, F. H.; VÁSQUEZ, G.; ROJAS A. M.; FUENMAYOR, M. E.; LOUREIRO, C. L.; PÉREZ-SCHAEL, I.; ESTES, M. K.; LIPRANDI, F. 1998. Norwalk virus infection in Venezuela. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **92**: 205-11.

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

RICHARDS, A.F.; LOPMAN, B.; GUNN, A.; CURRY, A.; ELLIS, D.; COTTERILL, H.; RATCLIFFE, S.; JENKINS, M.; APPLETON, H.; GALLIMORE, C.I.; GRAY, J.J.; BROWN, D.W. 2003. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. **Journal of Clinical Virology**, **26**: 109-115.

RAMIREZ, S.; GIAMMANCO, G.M.; DE GRAZIA, S.; COLOMBA, C.; MARTELLA, V.; ARISTA, S. 2009 Emerging GII.4 norovirus variants affect children with diarrhea in Palermo, Italy in 2006. **Journal of Medical Virology**, **81(1)**: 139-45.

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

RODRÍGUEZ-GUILLÉN, L.; VIZZI, E.; ALCALÁ, A. C.; PUJOL, F. H.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J. E. 2005. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. **Journal of Clinical Virology**, **33**: 104-9.

SAITOU, N.; NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, **4**: 406-425.

SANTOSHAM, M.; CHANDRAN, A.; FITZWATER, S.; FISCHER-WALKER, C.; BAQUI, A. H.; BLACK, R. 2010. Progress and barriers for the control of diarrhoeal disease. **Lancet**, **376**: 63–67.

SDIRI-LOULIZI, K.; AMBERT-BALAY, K.; GHARBI-KHELIFI, H.; SAKLY, N.; HASSINE, M.; CHOUCANE, S.; GUEDICHE, M.N.; POTHIER, P.; AOUNI, M. 2009. Molecular epidemiology of norovirus gastroenteritis investigated using samples collected from children in Tunisia during a four-year period: detection of the norovirus variant GGII.4 Hunter as early as January 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, **47 (2)**: 421-9.

SÁNCHEZ-FAUQUIER, A.; WILHELMI, I.; ROMAN, E.; COLOMINA, J.; MONTERO, V.; NEGREDO, A. 2005. Surveillance of human calicivirus in Spain. **Emerging Infectious Diseases Journal**, **11**: 1327-1329.

SECRETARIA DE POLÍTICA URBANA DA PJF/LABORATÓRIO DE CLIMATOLOGIA GEOGRÁFICA E ANÁLISE AMBIENTAL (LabCA - ICH / UFJF). 2009. Estação Climatológica Principal de Juiz de Fora. Centro de Pesquisas Sociais. Banco de Dados Departamento de Geociências, UFJF.

SILVA, P. A.; STARK, K.; MOCKENHAUPT, F. P.; REITHER, K.; WEITZEL, T.; IGNATIUS, R.; SAAD, E.; SEIDU-KORKOR, A.; BIENZLE, U.; SCHREIER, E. 2008. Molecular characterization of enteric viral agents from children in northern region of Ghana. **Journal of Medical Virology**, **80**: 1790-8.

SOARES, C. C.; SANTOS, N.; BEARD, R. S.; ALBUQUERQUE, M. C.; MARANHÃO, A. G.; ROCHA, L. N.; RAMÍREZ, M. L.; MONROE, S. S.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. 2007. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases Journal**, **13** : 1244-6.

STRAUB, T. M.; HÖNER, Z. U.; BENTRUP, K.; OROSZ-COGLAN, P.; DOHNALKOVA, A.; MAYER, B. K.; BARTHOLOMEW, R. A.; VALDEZ, C. O.; BRUCKNER-LEA, C.J.; GERBA, C.P.; ABBASZADEGAN, M.; NICKERSON, C.A. 2007. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. **Emerging Infectious Diseases Journal**, **13(7)**: 1117-8.

TACKET, C.O.; SZTEIN, M.B.; LOSONSKY, G.A.; WASSERMAN, S.S.; ESTES, M.K. 2003. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral

Norwalk virus-like particles in volunteers. **Clinical Immunology**, **108**: 241-247.

TACKET, C.O. 2005. Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. **Vaccine** **23**:1866-9.

TALAL, A. H.; MOE, C.L.; LIMA, A. A.; WEIGLE, K. A.; BARRETT, L.; BANGDIWALA, S. I.; ESTES, M. K.; GUERRANT, R. L. 2000. Seroprevalence and seroincidence of Norwalk-like virus infection among Brazilian infants and children. **Journal of Medical Virology**, **61**: 117-124.

TANAKA, H.; KISIELIUS, J.J.; UEDA, M.; ROCHA, M.; TIMENETSKY, M.C.S.T.; CARMONA, R.C. 1996. Norwalk-like virus associated gastroenteritis outbreak in São Paulo State-Brazil. In: XIV Internacional Congress for Tropical Medicine and Malaria, 14, Nagasaki, Japan. Abstracts Book, vl. p. 382.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M., KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** **24**: 1596-1599.

TAYEB, H. T.; DELA.CRUZ, D. M.; AL-QAHTANI, A.; AL-AHDAL, M. N.; CARTER, M. J. 2008. Enteric viruses in pediatric diarrhea in Saudi Arabia. **Journal of Medical Virology**, **80**: 1919-29.

TIMENETSKY, M.C.S.T.; KISIELIUS, J.J.; GRISI, S.J.F.E.; ESCOBAR, A.M.U.; UEDA, M.; TANAKA, H. 1993. Rotavírus, Adenovírus, Astrovírus, Calicivírus e Small Round Virus Particles em fezes de crianças, com e sem diarréia aguda, no período de 1987 a 1988, na Grande São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **53**: 275-280.

TIMENETSKY, M. C. S. T; ANDO, T; TANAKA, H.; NOEL, J. S.; PERET, T.; KISIELIUS, J J.1996. Characterization of small round structured viruses detected in Brazil by Reverse Transcription – PCR and Southern hybridization. In: XIV Internacional Congress for Tropical Medicine and Malaria, Nagasaki, Japan. Abstracts Books, vl. p. 382.

TODD, S.; PAGE, N.A.; DUNCAN-STEELE, A.; PEENZE, I.; CUNLIFFE, N.A. 2010. Rotavirus strain types circulating in Africa: Review of studies published during 1997-2006. **The Journal of Infectious Diseases** , **202**: 34–42.

TRUJILLO, A. A.; MCCAUSTLAND, K. A.; ZHENG, D. P.; HADLEY, L. A.; VAUGHN, G.; ADAMS, S. M.; ANDO, T.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. 2006. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**: 1405-1142.

TSUGAWA, T.; NUMATA-KINOSHITA, K.; HONMA, S.; NAKATA, S.; TATSUMI, M.; SAKAI, Y.; NATORI, K.; TAKEDA, N.; KOBAYASHI, S.; TSUTSUMI, H. 2006. Virological, serological, and clinical features of an outbreak of acute gastroenteritis due to recombinant genogroup II norovirus in an infant home. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**: 177–182.

TUAN, Z.C.; HIDAYAH, M.S.; CHAI, L.C.; TUNUNG, R.; GHAZALI, F.M.; SON, R. 2010. The scenario of norovirus contamination in food and food handlers. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, **20 (2)**: 229-37.

VINJÉ, J.; GREEN, J.; LEWIS, D. C.; GALLIMORE, C. I.; BROWN, D. W. G.; KOOPMANS, M.P.G. 2000. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of “Norwalk-like viruses”. **Archives of Virology**, **145**: 1-19.

VINJÉ, J.; HAMIDJAJA, R. A.; SOBEY, M. D. 2004. Development and amplification of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. **The Journal of Virological Methods**, **116**: 109-117.

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

VICTORIA, M.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; DE ABREU CORRÊA, A.; KOLESNIKOVAS, C.; LEITE, J. P.; MIAGOSTOVICH, M. P.; BARARDI, C. R. 2010a. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, **109**: 231-8.

VICTORIA, M.; GUIMARÃES, F. R.; FUMIAN, T. M.; FERREIRA, F. F.; VIEIRA, C. B.; SHUBO, T.; LEITE, J. P.; MIAGOSTOVICH, M. P. 2010b .One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Water and Health**, **8**:158-65.

WILHELMI, I.; ROMAN, E. & SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. **Clinical Microbiology and infection**, **9**: 247-262.

WOLFAARDT, M.; TAYLOR, M. B, BOOYSEN, H. F.; ENGELBRECHT, L.; GRABOW, W. O.; JIANG, X. 1997. Incidence of human calicivirus and rotavirus infection in patients with gastroenteritis in South Africa. **Journal of Medical Virology**, **51**: 290–296.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diarrhoeal diseases. Geneva: World Health Organization, 2009.

YOON, J. S.; LEE, S. G.; HONG, S. K.; LEE, S.A.; JHEONG, W.H.; OH, S. S.; OH, M. H.; KO, G. P.; LEE, C. H.; PAIK, S. Y. 2008. Molecular epidemiology of norovirus infections in children with acute gastroenteritis in South Korea, November 2005 through November 2006. **Journal of Clinical Microbiology**, **46**: 1474–7.

XAVIER, M. P .T. P.; OLIVEIRA, S. A.; FERREIRA, M. S. R.; VICTORIA, M.; MIRANDA, V.; SILVA, M. F. M.; STRINA, A.; BARRETO, M. L.; MIAGOSTOVICHT, M. P.; LEITE, J. P. G. 2009. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil . **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **42**: 438-444.

XI JN, GRAHAM DY, WANG KN, ESTES MK. 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. **Science**, **14**;**250 (4987)**:1580-3.

ZAHORSKY, J. 1929. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, **46**: 391-395.

ZHANG, X.; BUEHNER, N. A.; HUTSON, A.M.; ESTES, M. K.; MASON, H.S. 2006. Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. **Plant Biotechnology Journal** **4**: 419-32.

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

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

APÊNDICE A - COMPOSIÇÃO E PREPARO DE SOLUÇÕES

1 SOLUÇÃO UTILIZADA NA CLARIFICAÇÃO DE AMOSTRAS FECAIS

1.1 SOLUÇÃO 0,01M TRIS /HCL /CA⁺⁺(0,0015M) PH 7,2

1.1.1 Composição

Tris Base..... 0,65 g

Cloreto de cálcio..... 0,11 g

Água destilada (quantidade suficiente para- q.s.p).....500 mL

Ácido clorídrico q.s.p..... para ajustar o pH em 7,2

1.1.2 Preparo

- 1) Separe todo o material e proceda a pesagem.
- 2) Em um béquer, coloque o tris e o cloreto de cálcio pesados e a seguir adicione um pouco da água destilada para dissolver os reagentes. Não coloque toda a água de uma vez, pois ocorre expansão de volume pela própria reação.
- 3) Ajuste o pH em 7,2 com a adição gota a gota do ácido clorídrico, utilizando o pHmêtro. A seguir ajuste o volume final com a água destilada, utilizando uma proveta.

2 SOLUÇÕES UTILIZADAS NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

2.1 SUSPENÇÃO DE SÍLICA

2.1.1 Composição

Sílica.....	60 g
Água deionizada q.s.p.....	500 mL

2.1.2 Preparo

- 1) Pesar 60 g de sílica em um béquer, completar para 500mL com água deionizada, utilizando uma proveta, homogeneizar e deixar sedimentar por 24 h.
- 2) Após este tempo, retirar 430 mL do sobrenadante por aspiração e dispensar. Ressuspender a sílica para 500ml com água deionizada, utilizando uma proveta, homogeneizar e deixar sedimentar por mais 5 h.
- 3) A seguir, retirar 440 mL do sobrenadante por aspiração e desprezar. Adicionar 600 µL de ácido clorídrico puro e verificar o pH da suspensão, que deve ficar em 2.
- 4) Colocar um agitador magnético dentro do béquer para manter a suspensão de sílica em constante homogeneização e pipetar alíquotas de 5mL para frascos âmbar ou para microtubos de 1,5 mL envolvidos com papel alumínio.
- 5) Autoclavar por 20 min/121°C e estocar na geladeira.

2.2 TAMPÃO DE L6

2.2.1 Composição

Isotiocianato de guanidina.....	120 g
Tris-HCl 0,1 M pH 6,4.....	100 mL
EDTA 0,2 M pH 8,0.....	22 mL
Triton X-100.....	2,6 g

Ocorre uma expansão do volume, de modo que o volume final é de 200mL.

2.2.2 Preparo

- 1) Pesar o Triton X-100 e o Isotiocianato de guanidina e colocar em um béquer.
- 2) Medir o EDTA e o Tris -HCl e adicionar ao béquer.

3) Colocar um agitador magnético e deixar dissolver.

4) Armazenar em frascos estéreis.

2.3 TAMPÃO DE L2

2.3.1 Composição

Isotiocianato de guanidina..... 120 g

Tris-HCl 0,1 M pH 6,4..... 100 mL

Ocorre uma expansão do volume, de modo que o volume final é de 200mL.

2.3.2 Preparo

1) Pesar o Isotiocianato de guanidina e colocar em um béquer.

2) Medir o Tris -HCl e adicionar ao béquer.

3) Colocar um agitador magnético e deixar dissolver.

4) Armazenar em frascos estéreis.

2.4 SOLUÇÃO DE TRIS-HCL 0,1M pH 6,4 (utilizada nos tampões L6 e L2)

2.4.1 Composição

Tris Base.....1,41 g

Água destilada (quantidade suficiente para (q.s.p))..... 100 mL

Ácido clorídrico q.s.p..... para ajustar o pH em 6,4

2.4.2 Preparo

1) Pesar o tris e colocar em um béquer.

- 2) Adicionar um pouco da água destilada para dissolver o reagente.
- 3) Ajuste o pH em 6,4 com a adição gota a gota do ácido clorídrico, utilizando o pHmêtro.
- 4) Ajustar o volume em 100 mL, utilizando uma proveta.

2.5 SOLUÇÃO DE EDTA 0,2 M pH 8,0 (utilizada no preparo do tampão L6)

2.5.1 Composição

EDTA.....	3,72 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL
Ácido clorídrico q.s.p.....	para ajustar o pH em 8,0

2.5.2 Preparo

- 1) Pesar o EDTA e colocar em um béquer.
- 2) Adicionar um pouco da água destilada.
- 3) Ajuste o pH em 8,0 com a adição gota a gota do ácido clorídrico, utilizando o pHmêtro.
- 4) Ajustar o volume em 100 mL, utilizando uma proveta.

2.6 SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 10M (para descarte dos tampões L6 e L2)

2.6.1 Composição

Hidróxido de sódio.....	200 g
Água destilada q.s.p.....	500 mL

2.6.2 Preparo

- 1) Pesar o hidróxido de sódio e colocar em um béquer.
- 2) Adicionar a água destilada aos poucos até completar o volume de 500 mL, com auxílio de uma proveta.

2.7 SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO 10% (para descontaminar o material)

2.7.1 Composição

Solução de hipoclorito de sódio comercial..... 200 g
 Água destilada q.s.p..... .1000 mL

2.7.2 Preparo

- 1) Medir o hipoclorito de sódio comercial em proveta e colocar em um béquer.
- 2) Adicionar a água destilada aos poucos até completar o volume de 1000 mL, com auxílio de uma proveta, e homogeneizar.

2.8 SOLUÇÃO DE ETANOL 70%

2.8.1 Composição

Etanol 95%..... 700 mL
 Água destilada q.s.p.....1000 mL

2.8.2 Preparo

- 1) Medir o etanol e colocar em uma proveta.
- 2) Adicionar a água destilada aos poucos até completar o volume de 1000 mL e homogeneizar.

3) O uso do Alcoômetro de Gay-Lassac, quando disponível no laboratório, garante maior precisão no preparo da solução.

3 SOLUÇÕES UTILIZADAS NO PROCESSO DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

3.1 TAMPÃO TBE 5X 0,5 M

3.1.1 Composição

Tris (hidroximetil-tris-aminometano) (SIGMA®).....	54 g
EDTA 0,5M pH 8.....	20mL
Ácido Borico.....	27,5g
Água destilada q.s.p.	1000mL

3.1.2 Preparo

- 1) Em um bécher de 1000mL foram adicionados os reagentes e homogeneizados com agitador magnético em 800mL de água.
- 2) O conteúdo foi transferido para proveta de 1000mL e o volume final completado.

3.2. TAMPÃO TBE 1X 0,5 M, pH 8,4

3.2.1 Preparo

- 1) Em uma proveta de 1000mL foram adicionados : 200mL do tampão TBE 5X e 800 mL de água destilada, perfazendo o volume final de 1000mL.
- 2) A solução foi transferida para um bécher de 1000mL, homogeneizada e posteriormente armazenada em frasco de vidro a 22-25°C.

3.3 GEL DE AGAROSE A 1,5%

3.3.1 Composição

Agarose (Invitrogen®).....	1,2g
Tampão TBE 1X 0,5M pH 8,4.....	80mL

3.3.2 Preparo

- 1) A agarose foi pesada e colocada em um erlenmeyer de 250mL.
- 2) Foram adicionado 80mL de tampão TBE 1X 0,5M. O erlenmeyer foi levado ao forno de microondas por 1minuto (em potência alta) até que a agarose fosse dissolvida, deixando resfriar até +/- 50°C.
- 3) A seguir, a agarose foi colocada na cuba de eletroforese, tendo sido evitada a formação de bolhas.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer nº 049/2007

Protocolo CEP-UFJF: 990.036.2007 **FR:** 124418 **CAAE:** 0028.0.180.000-07

Projeto de Pesquisa: "Estudo da prevalência da diarreia aguda em crianças atendidas em hospitais públicos e privados no município de Juiz de Fora – MG, e sua associação com os rotavírus"

Pesquisador Responsável: Mônica Couto Guedes Sejanas da Rocha

Pesquisadores Participantes: Maria Luzia da Rosa e Silva, Sandra Helena Cerrato Tibiriçá, Iná Pires de Carvalho, Gilmar Soares da Silva.

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora, ICB/Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia.

Sumário/comentários

O CEP analisou o Protocolo 990.036.2007, Grupo III e considerou que:

- Este é um estudo justificado pelos autores pela relevância de estudos epidemiológicos sobre as doenças diarreicas, em especial as rotaviruses. Segundo os autores, os dados obtidos poderão contribuir para um maior conhecimento desta infecção e dos tipos de rotavírus mais prevalentes em nosso meio, além de fornecer subsídios para o desenvolvimento de políticas públicas de saúde no município de Juiz de Fora.
- A metodologia a ser empregada para a investigação é adequada aos objetivos do estudo, e será baseada na coleta de dados clínicos em prontuários e análise de fezes para pesquisa de rotavírus, obtidas dos pacientes que apresentam sintomas de doença diarreica.
- O embasamento teórico apresentado sustenta o objetivo do estudo.
- Características da população a estudar: é proposta a avaliação de aproximadamente 5000 prontuários hospitalares de 2005 a 2008 de pacientes, crianças de 0 a 5 anos, atendidos em diferentes hospitais do município de Juiz de Fora, além da análise de aproximadamente 2000 amostras fecais coletadas de pacientes deste mesmo perfil atendidos nos hospitais participantes.
- O estudo prevê a coleta de dados em 4 hospitais, dois públicos (Santa Casa de Misericórdia e Hospital Universitário da UFJF) e dois privados (Hospital Albert Sabin e Hospital Monte Sinai). Encontra-se anexado ao protocolo documento de autorização da coleta de dados e material das instituições citadas.
- Os custos e planejamento orçamentário encontram-se anexados ao protocolo, sendo que o custeio será de responsabilidade do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF, além de verba já existente em projeto apoiado pela FAPEMIG cujo termo de outorga foi apresentado.
- O cronograma foi devidamente apresentado em meses, considerando-se a provação do protocolo neste comitê em março de 2007, para o início da coleta de dados e materiais, com estudo previsto para 24 meses de duração.
- Avaliação de risco foi realizada, sendo a pesquisa classificada como de risco mínimo.
- O termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE está claro, em linguagem adequada para compreensão do sujeito, apresenta descrição suficiente dos procedimentos de coleta de dados, e considera a avaliação de risco.
- A qualificação do pesquisador responsável é pertinente para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.
- O pesquisador responsável deve encaminhar a este comitê um relatório final da pesquisa.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Situação: Projeto Aprovado
Juiz de Fora, 17 de maio de 2007.


Prof. Dra. Angela-Maria Golner
Coordenadora – CEP/UFJF

RECEBI
DATA: ____ / ____ / 2007
ASS: _____

ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP UFJF
36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL


Anexo ao Parecer nº 049/2007

Protocolo CEP-UFJF: 990.036.2007 FR: 124418 CAAE: 0028.0.180.000-07
Projeto de Pesquisa: "Estudo da prevalência da diarreia aguda em crianças atendidas em hospitais públicos e privados no município de Juiz de Fora – MG, e sua associação com os rotavirus"
Pesquisador Responsável: Mônica Couto Guedes Sejanas da Rocha
Pesquisadores Participantes: Maria Luzia da Rosa e Silva, Sandra Helena Cerrato Tibiriçá, Iná Pires de Carvalho, Gilmara Soares da Silva.
Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora, ICB/Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia.
Matéria Analisada: Solicitação de alteração da data de término do projeto

Sumário/comentários

O CEP/UFJF toma conhecimento da solicitação e da justificativa para alteração da data de término do referido projeto de pesquisa do ano de 2008 para o ano de 2010. Após avaliação do pedido e do parecer emitido, este Comitê manifesta-se pela aprovação da solicitação. Sendo assim, a documentação será anexada ao protocolo e será arquivada.

Juiz de Fora, 17 de abril de 2008


Prof. Ms. Cyntia Pace Schmitz Correa
Coordenadora – CEP/UFJF

RECEBI
DATA: _____ / _____ / 2008
ASS: _____

ANEXO C



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP UFJF
36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer nº 281/2006

Protocolo CEP-UFJF: 903.209.2006 **FR:** 109707 **CAAE:** 0137.0.180.000-06

Projeto de Pesquisa: "INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE PATÓGENOS VIRAIS E BACTERIANOS ASSOCIADOS A MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NO TRATO GASTROINTESTINAL EM CRIANÇAS E ADULTOS NA ZONA DA MATA MINEIRA"

Pesquisador responsável: MARIA LUIZA DA ROSA E SILVA

Pesquisadores participantes: INÁ PIRES DE CARVALHO, CLÁUDIO GALUPPO DINIZ, SANDRA HELENA CERRATO TIBIRIÇÁ, JOSÉ PAULO GAGLIARDI LEITE, MARIA AUXILIADORA ROQUE DE CARVALHO, LUIZ DE MACEDO FARIAS, VÂNIA LÚCIA DA SILVA, MÔNICA COUTO GUEDES SEJANIS DA ROCHA, GILMARA SOARES DA SILVA.

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora – Instituto de Ciências Biológicas

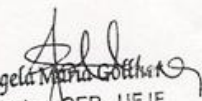
Sumário/comentários

O CEP analisou o Protocolo 903.209.2006, Grupo III e considerou que:

- O projeto encontra-se muito bem justificado, de acordo com objeto proposto para ser investigado e a revisão bibliográfica demonstrada. O valor científico da proposta é extremamente relevante no que diz respeito à importância da realização de estudos epidemiológicos que avaliem a variação de vírus encontrados em doenças do trato gastrointestinal, para que se possam estabelecer critérios, rotinas e tratamentos mais direcionados. De acordo com os pesquisadores, no Brasil, tais doenças são uma das mais frequentes na infância, sendo uma importante causa de procura por atendimento clínico. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a doença diarreica é a primeira ou a segunda maior causa de óbitos e estimativas apontam a ocorrência de cerca de um milhão de mortes anuais entre crianças com menos de cinco anos. Os pesquisadores descrevem vários tipos de vírus relacionados com as doenças gastrointestinais (os rotavírus, os vírus Norwalk, os astrovírus e os adenovírus, além das doenças causadas por ação bacteriana, principalmente pelos microorganismos anaeróbios do grupo *Bacteroides fragilis* e os anaeróbios facultativos do grupo dos bastonetes Gram negativos entéricos da família *Enterobacteriaceae* como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Shigella sp.* Os pesquisadores também justificam que a identificação convencional destes patógenos a partir de amostras fecais por cultura seletiva e características bioquímicas é complexo e dispendioso; e que métodos moleculares têm sido desenvolvidos para detecção rápida destes microorganismos.

- Os objetivos gerais deste estudo são: ① contribuir para a geração de dados epidemiológicos sobre a ocorrência de reservatórios naturais e etiologia de agentes virais e bacterianos envolvidos em manifestações clínicas de doenças do trato gastrointestinal no município de Juiz de Fora, na Zona da Mata Mineira e ② Contribuir para formação de recursos humanos especializados (alunos de graduação e pós-graduação). Os objetivos específicos são: ① detectar a presença de rotavírus e adenovírus nos espécimes fecais obtidas; ② avaliar a incidência e a sazonalidade das rotavirose; ③ caracterização fenotípica (por EGPA) e genotípica (por RT-PCR) das amostras de rotavírus detectadas; ④ detectar a presença de astrovírus e vírus Norwalk nos espécimes fecais obtidos; ⑤ isolar e identificar linhagens bacterianas dos gêneros *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Shigella sp.*; ⑥ avaliar a ocorrência de linhagens de *B. fragilis* enterotoxigênicas e ⑦ Genotipar as diferentes linhagens bacterianas.

- Serão analisados pelo menos 500 amostras fecais provenientes de crianças apresentando manifestações clínicas do trato gastrointestinal, de 0 a 5 anos de idade, atendidas na Policlínica de Benfica (Regional Norte) e no Pronto Atendimento Infantil – PAI, em Juiz de Fora. Os espécimes fecais serão colhidos nas unidades de saúde por enfermeiras previamente treinadas ou nos domicílios pelos responsáveis após as orientações passadas pelas enfermeiras. As amostras serão armazenadas em potes descartáveis e levadas ao Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF. As amostras serão codificadas para preservar o anonimato dos doadores cujos responsáveis deverão, no ato da coleta, consentir com sua utilização após leitura do TCLE. Além disso, os pesquisadores irão aplicar um questionário para coleta dos dados epidemiológicos pertinentes à pesquisa (tal questionário está anexado ao protocolo da pesquisa). Os pesquisadores descrevem detalhadamente como farão as análises necessárias para a detecção dos agentes virais e/ou bacterianos propostos.


Dra. Angela Maria Góthman
Coordenadora CEP - UFJF

ANEXO D

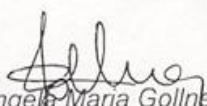


UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
 PRO-REITORIA DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
 36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

- A revisão e as referências bibliográficas sustentam os objetivos do estudo.
- O orçamento foi apresentado de acordo com a planilha pertinente aos termos do Edital de Pesquisa FAPEMIG/SUS 005/2006, cujos formulários se encontravam-se em anexo. O custo final do projeto foi de R\$ 347.530,05, sendo R\$ 18.640,00 com gastos em diárias, R\$ 130.900,00 com gastos em material de consumo, R\$ 17.000,00 com gastos em passagens aéreas, R\$ 16.549,05 em gastos com despesas operacionais e R\$ 164.441,00 em gastos com aquisição de materiais permanentes. Todos estes gastos estão justificados na metodologia que será empregada na pesquisa.
- O cronograma não está descrito em meses, e sim em Ano 1 e 2 e Meses de 01 a 12, em um total de 24 meses. Não há menção sobre a data de início e término do projeto. Os pesquisadores justificaram tal fato alegando que "o início da pesquisa está condicionado à aprovação, assinatura do termo de outorga e liberação dos recursos pela FAPEMIG, de acordo com o edital 005/2006 desta mesma instituição.
- O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, está em linguagem adequada, acessível à compreensão da metodologia e dos desfechos da pesquisa para os responsáveis pelos menores que participarão da pesquisa.
- As qualificações dos pesquisadores são pertinentes ao tema de estudo proposto.
- Salientamos que os pesquisadores deverão encaminhar a este comitê o relatório final da pesquisa.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

SITUAÇÃO: Projeto Aprovado
 Juiz de Fora, 23 de Novembro de 2006.


 Prof. Dra. Angela Maria Gollner
 Coordenadora - CEP/UFJF