



Novo genótipo de norovírus em doentes com gastroenterite aguda, 2011-2013

Inês Costa¹, João Mesquita², Elisabete Veiga¹,
Mónica Oleastro^{1,3}, Maria São José Nascimento⁴

monica.oleastro@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Biologia Molecular. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Viseu.

(3) Laboratório Nacional de Referência das Infeções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(4) Laboratório de Microbiologia. Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Introdução

Norovírus (NoV) são um vasto grupo de vírus geneticamente relacionados que pertencem ao género *Norovirus* e à família *Caliciviridae*. Têm um genoma constituído por RNA de cadeia simples, de polaridade positiva, organizado em três sequências de leitura abertas (ORF - Open read frame), ORF1, ORF2 e ORF3 (*Figura 1*). A sequência ORF1 codifica seis proteínas não estruturais, entre elas a RNA polimerase. As duas proteínas que constituem a cápside, a proteína *major* VP1 e a proteína *minor* VP2, são codificadas pela ORF2 e ORF3 respetivamente. NoV apresentam uma elevada diversidade genética, sendo classificados em cinco genogrupos (GI-GV), os quais são subdivididos em genótipos. Apenas NoV dos genogrupos GI (8 genótipos), GII (19 genótipos) e GIV têm sido associados a infeções humanas. Os restantes genogrupos têm sido encontrados apenas em animais ⁽¹⁾.

A transmissão deste vírus entérico é fecal-oral, quer através da ingestão de água e alimentos contaminados, quer por contacto direto pessoa-a-pessoa. Constituem também importantes fontes de contaminação, o contacto da mucosa oral com os aerossóis formados durante o vômito e o contacto com superfícies contaminadas com material fecal ou vômito. NoV é um dos agentes mais frequente da infeção gastrointestinal aguda, afetando todos os grupos etários, e está também na origem da maioria dos surtos de origem alimentar ⁽²⁾.

Reconstruindo a história evolutiva do genogrupo GII.4, o mais frequentemente associado à infeção no homem, tem-se observado

um grande impacto na saúde humana, causado pelo aparecimento de novas variantes, que resultam de recombinação inter e intragenótipos ^(1,2). A variabilidade antigénica, em resposta à imunidade adquirida, favorece o aparecimento de novas variantes de GII.4 ⁽¹⁾, que ocorre com uma regularidade de dois a três anos ⁽⁴⁾. Diversos estudos mostram uma correlação entre o aparecimento de uma nova variante de GII.4 e o aumento, quer do número de surtos, quer da taxa de ataque por surto ^(2,3,5).

Desde meados da década de 90, as novas variantes de GII.4 foram responsáveis por 62% a 80% dos surtos provocados por vírus entéricos, a nível mundial ⁽¹⁾. Em março de 2012, surgiu uma nova variante GII.4, que foi identificada pela primeira vez na Austrália, sendo designada NoVGII.4 Sidney2012 ^(1,5).

Objetivos

Neste estudo pretendeu-se analisar a diversidade genética das estirpes de NoV em doentes com quadro clínico de gastroenterite aguda, que recorreram às urgências ou consultas hospitalares entre maio de 2011 e abril de 2013, e avaliar a presença da nova variante NoV GII.4 Sidney2012 em Portugal.

Material e métodos

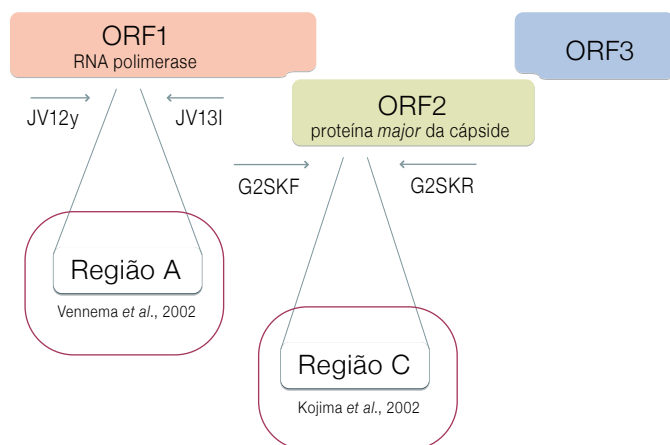
Foi utilizado um modelo de estudo observacional, transversal. Foram incluídos no estudo todos os doentes com um quadro clínico de infeção gastrointestinal com diarreia aguda, que se deslocaram a 13 Hospitais de Portugal Continental entre maio de 2011 e abril de 2013. Durante este período, todos os laboratórios hospitalares recolheram e prepararam uma amostra de fezes de cada um dos doentes elegíveis para o estudo.

O RNA viral foi extraído com um método automático NucliSens® easyMAG™ (bioMérieux). Na reação de RT-PCR foi usado o kit comercial One-Step RT-PCR (Qiagen), e utilizados dois pares de *primers*, um para a região da RNA polimerase viral (região A) ⁽⁶⁾ e o outro para a região da proteína major da cápside viral (região C) ⁽⁷⁾ (*Figura 1*). Os produtos amplificados foram purificados com ExoSap (GE Healthcare) e sequenciados, por sequenciação de Sanger com Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems), no Sequencer Analyser ABI-Prism 3130 xl (PE Applied Biosystems). As sequências

artigos breves_ n. 11

foram analisadas usando o programa de análise e genotipagem de NoV disponibilizado pelo RIVM (*National Institute for Public Health and the Environment*; www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool). Foi feita uma análise filogenética das sequências obtidas com Software MEGA 5.1 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Para a análise descritiva dos dados obtidos recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas.

Figura 1: Representação esquemática do genoma de norovírus e localização das regiões - região A e região C usadas para a genotipagem das estirpes.



Resultados

Entre maio de 2011 e abril de 2013, foram recebidas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) 580 amostras de fezes, isoladas de doentes com gastroenterite aguda. Foram identificadas como positivas para NoV, 67 (11,6%) amostras, das quais 41 (61,2%) foram genótipo II (GII). As 41 amostras genotipadas eram provenientes de doentes com idades compreendidas entre dois meses e 91 anos, sendo 25 (61,0%) do género masculino e 16 (39,0%) do género feminino.

As amostras obtidas entre maio 2011 e abril 2012 (n=22) mostraram uma grande diversidade de genótipos, nomeadamente GII.1 (1/22) 4,5%, GII.3 (1/22) 4,5%, GII.6 (1/22) 4,5%, GII.8 (1/22) 4,5%, e com predominio do genótipo GII.4 New Orleans 2009 (81,8%, 18/22) (Gráfico 1). A partir de maio de 2012, observou-se uma mudança do genótipo circulante. De facto, todas as amostras analisadas (n=19) foram identificadas como sendo a nova variante GII.4 Sidney_2012 (Gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição temporal das estirpes de norovírus, com base no resultado da análise da genotipagem da região A e C, maio 2011- abril 2013.



Discussão e conclusão

Este é um dos primeiros estudos a descrever a circulação da nova variante NoV GII.4 Sidney2012 em Portugal (8). Esta nova variante, identificada pela primeira vez na Austrália em 2012 (9), rapidamente, e devido aos fluxos migratórios, teve uma disseminação mundial, tendo sido responsável por um aumento do número de surtos de gastroenterite em todo o mundo nos últimos dois anos (1, 5). Portugal não foi exceção, e este estudo comprova a presença e o predomínio da nova variante NoV GII.4 Sidney2012 desde maio de 2012. No entanto, e por forma a relacionar-se esta estirpe emergente de NoV a surtos de gastroenterite no nosso país, será da maior importância desenvolver um sistema de vigilância de surtos de toxinfecções alimentares de âmbito nacional, à semelhança de outros países europeus.

Agradecimentos

Às unidades de saúde que participaram neste estudo nomeadamente, o Centro Hospitalar Cova da Beira, o Centro Hospitalar de Setúbal, o Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, o Centro Hospitalar do Médio Tejo, o Centro Hospitalar Tondela/Viseu, o Hospital Cascais Dr. José de Almeida, o Hospital da Luz, o Hospital de Santo António, o Hospital Distrital de Santarém, o Hospital Dona Estefânia, o Hospital Fernando Fonseca, o Hospital Pediátrico de Coimbra, o Hospital Universitário de Coimbra pela preparação do material biológico. Ao Dr. Alfredo Rodrigues da Isoder/RBiopharm pelo transporte para o INSA de todo o material biológico. À Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana / INSA pela realização da sequenciação capilar. À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.



artigos breves_ n. 11

Referências bibliográficas:

- (1) Eden J-S, Tanaka MM, Boni MF, et al. Recombination within the Pandemic Norovirus GII.4 Lineage. *J. Virol.* 2013;87(11): 6270-82. [LINK](#)
- (2) Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF, et al. Norovirus Immunity and the Great Escape. *PLoS Pathog.* 2012; 8(10): e1002921. [LINK](#)
- (3) Marshall JA, Bruggink LD. The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8(4):1141-9. [LINK](#)
- (4) Bennett S, MacLean A, Miller RS, et al. Increased norovirus activity in Scotland in 2012 is associated with the emergence of a new norovirus GII.4 variant. *Euro Surveill.* 2013;18(2): pii=20349. [LINK](#)
- (5) van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, et al. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill.* 2013 ;18(1) : :pii=20345. [LINK](#)
- (6) Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Virol.* 2002;25(2):233-5.
- (7) Kojima S, Kaheyama T, Fukushi S, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Vir Methods.* 2002;100(1-2):107-14.
- (8) Mesquita JR, Costa I, Oleastro M, et al. First report of a norovirus outbreak caused by the new variant Sydney 2012 in Portugal. *J Infect Dev Ctries.* (In press).
- (9) Wong TH, Dearlove BL, Hedge J, et al. Whole genome sequencing and de novo assembly identifies Sydney-like variant Noroviruses and recombinants during the winter 2012/2013 outbreak in England. *J. Virol.* 2013;10: 335. [LINK](#)