

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO
PARASITO-HOSPEDEIRO

NATHÂNIA DÁBILLA ALVES SILVA

Avaliação da ocorrência, caracterização molecular e determinação da carga viral de Norovírus em amostras de fezes e *swab* nasal provenientes de crianças atendidas em um hospital de Goiânia, Goiás.

Goiânia
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Alves Silva, Nathânia Dábilla

Avaliação da ocorrência, caracterização molecular e determinação da carga viral de Norovírus em amostras de fezes e swab nasal provenientes de crianças atendidas em um hospital de Goiânia, Goiás. [manuscrito] / Nathânia Dábilla Alves Silva. - 2016. ciii, 103 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2016.
Anexos. Apêndice.
Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Norovírus. 2. Crianças. 3. Gastroenterite viral. 4. Carga viral. 5. Swab nasal. I. Borges de Lima Dias e Souza, Menira, orient. II. Título.

CDU 579

NATHÂNIA DÁBILLA ALVES SILVA

Avaliação da ocorrência, caracterização molecular e determinação da carga viral de Norovírus em amostras de fezes e *swab* nasal provenientes de crianças atendidas em um hospital de Goiânia, Goiás.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Menira Borges de Lima Dias e Souza

Goiânia
2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Nathânia Dábilla Alves Silva		
E-mail:	nathaniadabilla@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input type="checkbox"/> Sim	<input checked="" type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Não possui		
Agência de fomento:	Não possui		Sigla:
País:	UF:	CNPJ:	
Título:	Avaliação da ocorrência, caracterização molecular e determinação da carga viral de Norovírus em amostras de fezes e swab nasal provenientes de crianças atendidas em um hospital de Goiânia, Goiás.		
Palavras-chave:	norovírus, crianças, ambiente nosocomial, gastroenterite viral, swab nasal, carga viral.		
Título em outra língua:	Assessment of occurrence, molecular characterization and determination of viral load Norovirus in stool samples and nasal swabs from children attended at a hospital in Goiânia, Goiás.		
Palavras-chave em outra língua:	norovirus, children, nosocomial environment, viral gastroenteritis, nasal swab, viral load.		
Área de concentração:	Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	13/04/2016		
Programa de Pós-Graduação:	Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro		
Orientador (a):	Menira Borges Lima Dias e Souza		
E-mail:	menirasouza@gmail.com		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Nathânia Dábilla Alves Silva
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 10 / 06 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Nathânia Dábilla Alves Silva

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Menira Borges Lima Dias e Souza

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Menira Borges de Lima Dias e Souza

2. Prof^a. Dr^a. Fabíola Souza Fiaccadori

3. Prof^a. Dr^a. Divina das Dores de Paula Cardoso

Data: 13/04/2016

AGRADECIMENTOS

À professora e minha orientadora neste trabalho, Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza. Obrigada pela oportunidade, dedicação, amizade, ensinamentos, correções, acompanhamento e apoio. Tenho você como uma amiga, e às vezes até mãe, aprendi muito com você, as palavras não são suficientes para descrever o quanto sou grata.

Às professoras Dr^a. Divina das Dores de Paula Cardoso, Dr^a. Fabíola Souza Fiaccadori, Dr^a. Keli Maria Cardoso de Souza, pela ajuda, sugestões e colaboração neste trabalho.

À minha banca de qualificação, Prof^a. Dr^a. Fabíola Souza Fiaccadori, Prof. Dr. Hugo Delleon da Silva, Prof^a. Dr^a. Márcia Alves Dias Matos, por todas as contribuições e sugestões para o aprimoramento do trabalho. À professora Megmar dos Santos Carneiro, pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos meus companheiros que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Virologia Humana, Thaís Santos, Thaís Santana, Ítalo, Hugo, Romário, Marina, Ivana, Kareem, Dayane, Thainara Calixto, Thaynara Nogueira, Thairiny, Raíssa, Mariana, Terezinha e em especial ao Tom, Anniely e Francielly, Tâmera, pela amizade, apoio e pela colaboração na execução deste trabalho.

Às minhas amigas Anniely, Francielly e Tâmera, com as quais aprendi muito, pela paciência em me ensinar, pela ajuda no desenvolvimento do meu trabalho e pela grande amizade que vou levar para a vida toda.

À minha família, em especial ao meu marido e minha mãe, que estiveram sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando a continuar firme e forte com os meus objetivos.

Ao professor André Kipnis, pela grande colaboração com este trabalho e pelos ensinamentos. Ao Fábio Muniz, do Laboratório de Bacteriologia Molecular, pelos ensinamentos e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À Viviane Lopes Rocha, responsável pelo sequenciador do IPTSP/UFG, obrigada pelas colaborações no final do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro (PPGBRPH) pela oportunidade.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela bolsa concedida.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

SUMÁRIO

FIGURAS, QUADROS, TABELAS E ANEXOS	vii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO – REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 HISTÓRICO	1
1.2 PROPRIEDADES GERAIS	2
1.2.1 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO	2
1.2.2 ESTRUTURA MORFOLÓGICA, GENÔMICA E PROTEICA	3
1.2.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	5
1.3 PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	6
1.4 SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA	9
1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	11
1.6 EPIDEMIOLOGIA	14
1.7 TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE	29
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivos específicos	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 Local de Estudo	25
4.2 Delineamento e População de estudo	25
4.3 Coleta e preparo das Amostras Clínicas (fezes e swab nasal)	27
4.4 Determinação do <i>status</i> secretor (antígeno H-1)	27
4.4.1 Fenotipagem do fator secretor (detecção do antígeno H-1)	27
4.4.2 Confirmação do fenótipo Se-: genotipagem do gene FUT2	28
4.4.2.1 Extração do DNA genômico	28
4.4.2.2 PCR para amplificação do gene FUT2	29
4.4.2.3 Digestão com enzima de restrição	29
4.5 Detecção e determinação da carga viral de NoV	30
4.5.1 Plasmídeo para realização do ensaio de RT-qPCR <i>TaqMan</i> duplex	30
4.5.2 Curva padrão para o ensaio de RT-qPCR <i>TaqMan</i> duplex para NoV- GI e NoV-GII	30

4.5.3	Determinação da carga viral de NoV nas amostras clínicas por RT-qPCR <i>TaqMan</i> duplex	32
4.5.3.1	Extração do RNA viral da amostra fecal	32
4.5.3.2	Extração do RNA viral da amostra respiratória	32
4.5.3.3	RT-qPCR <i>TaqMan</i> duplex de NoV – GI e GII para determinação da carga viral	32
4.6	Detecção de NoV por RT-PCR HuCV multiplex convencional	33
4.6.1	Extração do RNA viral	33
4.6.2	RT-PCR multiplex para detecção de HuCV (NoV/SaV)	33
4.7	Sequenciamento genômico e análise filogenética das amostras positivas para NoV	35
4.8	Análise estatística	36
5	RESULTADOS	37
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
	ANEXOS	79

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Micrografia eletrônica de partículas de NoV (A) e representação esquemática da partícula viral (B) de NoV.	3
Figura 2	Representação da organização genômica de NoV.	4
Figura 3	Representação esquemática das regiões alvo para detecção do genoma viral.	13
Figura 4	Fluxograma da metodologia do estudo.	26
Figura 5	Índice de positividade para NoV em relação ao índice pluviométrico (mm ³) (A) e a umidade relativa do ar (%) (B), considerando o período de um ano (maio/2014 a abril/2015).	41
Figura 6	Análise filogenética de uma sequência parcial (389/378 pb) do capsídeo de NoV (região C) detectados em amostras fezes e <i>swab</i> nasal de crianças com ou sem sintomas de GEA.	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Características de diferentes estudos de detecção e caracterização molecular de NoV em crianças, conduzidos em diversos países	17
Quadro 2	Iniciadores e sondas utilizados no ensaio RT-qPCR <i>TaqMan</i> duplex NoV – GI e NoV - GII	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características gerais da população de estudo (N=219)	37
Tabela 2	Análise univariada das características gerais das crianças em relação à positividade para NoV em amostras de fezes	39
Tabela 3	Análise univariada das características gerais das crianças em relação à positividade para NoV em amostras de <i>swab</i> nasal	42
Tabela 4	Carga viral em relação aos genótipos das amostras sequenciadas	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Número de casos positivos para NoV em relação as duas metodologias utilizadas (RT-qPCR <i>TaqMan</i> duplex e RT-PCR convencional).	38
------------------	---	----

Gráfico 2	Porcentagem de casos positivos para NoV em relação aos sintomas apresentados pelos pacientes.	40
Gráfico 3	Distribuição dos genótipos em relação aos meses, considerando os positivos para NoV (fezes e <i>swab</i>). GI.? e GII.? são amostras positivas que não foram genótipadas.	45

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Parecer do comitê de ética em pesquisa	79
Anexo 2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	84
Anexo 3	Ficha de investigação clínica	87

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ASCs	células secretoras de anticorpo
aa	aminoácido
AGSH	antígeno do grupo sanguíneo humano
CaCV	calicivírus canino
Ct	<i>cycle threshold</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> – DNA complementar
CG	cópias genômicas
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> – ácido desoxirribonucléico
DO	densidade óptica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EIE	ensaio imunoenzimático
FAM	corante reporter 6-carboxifluoresceína
FCV	<i>Feline calicivirus</i> – calicivírus felino
FDA	<i>USA Food and Drug Administration</i>
FUT	fucosiltransferase
GEA	gastroenterite aguda
HCl	ácido clorídrico
HV	<i>Hawai virus</i>
HuCV	calicivírus humano
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFN- γ	interferon gama
IFN- α	interferon alfa
IL	interleucina
IME	imunomicroscopia eletrônica
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
Kb	quilobases
KCl	cloreto de potássio
kD	quilodaltons
LB	meio de cultura Luria Bertani
ME	microscopia eletrônica

MEM	meio essencial mínimo
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mM	Milimolar
MNV	<i>murine norovirus</i> – norovírus murino
ng	nanograma
nm	nanômetro
NoV	norovírus
NV	<i>Norwalk vírus</i>
NS	<i>non-structural</i>
NTPase	nucleosídeo trifosfatase
pb	pares de bases
PBMC	células mononucleares de sangue periférico
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
Pro	protease
R	coeficiente de correlação
RE	retículo endoplasmático
RIA	radioimunoensaio
RLA	região de leitura aberta
RT-qPCR	reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa em tempo real
RNA	ácido ribonucléico
S	<i>Shell</i>
Se+	secretor positivo
Se-	secretor negativo
SMV	<i>Snow Mountain Virus</i>
SNARE	<i>soluble NSF attachment receptor</i>
SVI	síndrome do vômito de inverno
TAE	Tampão Tris/Acetato/EDTA
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
VLP	<i>virus - like particle</i>
VP	proteína viral
VAP-A	Vesículas de membrana associadas à proteína A

RESUMO

Os norovírus (NoVs) são importantes agentes virais causadores de gastroenterite aguda (GEA), atingindo indivíduos de todas as idades em diversas partes do mundo, porém os maiores índices de morbimortalidade ocorrem principalmente nas crianças menores de cinco anos e idosos. O objetivo do presente estudo foi realizar a pesquisa de NoV, através da Reação em Cadeia pela Polimerase Pós-Transcrição Reversa (RT-PCR) e por tempo real (RT-qPCR) em amostras fecais e *swab* nasal de crianças com até seis anos de idade, com e sem sintomas de GEA. As amostras foram coletadas no Hospital Materno Infantil, entre maio/2014 e maio/2015. Procedeu-se ainda à determinação do *status* secretor das crianças, por Ensaio Imunoenzimático e genotipagem (gene FUT2), em sedimento de células epiteliais do *swab* nasal. Foi observado um índice de positividade global de 17% (37/219) para NoV nas fezes, sendo que destas crianças positivas, 48,6% (18/37) apresentavam sintomas de GEA. A carga viral média nas amostras de fezes de crianças com sintomas foi $2,59 \times 10^{10}$ CG/g e $1,37 \times 10^9$ CG/g nas assintomáticas. Observou-se maior positividade para NoV GII (70%) quando comparado ao GI (30%) e maior positividade nas crianças de até 24 meses de idade (67,5%), entretanto este dado não foi estatisticamente significativo. Quanto ao *status* secretor das crianças positivas para NoV nas fezes, 94,6% *status* secretor positivo. Os NoV foram detectados em praticamente todos meses do estudo, não sendo observado padrão de circulação definido em relação às estações seca e chuvosa. A maioria das crianças positivas para NoV (70%) tinham o registro de terem recebido pelo menos a primeira dose da vacina contra Rotavírus, sendo a carga viral mais elevada detectada entre crianças vacinadas. O RNA de NoV foi ainda detectado em 8,7% (19/219) das amostras de *swab* nasal das crianças e destas, 58% apresentavam sintomas de GEA. A carga viral média nas amostras de *swab* das crianças sintomáticas foi $2,10 \times 10^8$ CG/mL e nas assintomáticas $2,41 \times 10^7$ CG/mL. Foi observada elevada variabilidade de genótipos de NoV no estudo (GI.2, GI.3, GI.5, GII.3, GII.4 e GII.6), com maior predominância de GII.4 (28,6%), sendo este o primeiro relato de NoV GI.5 no Brasil. Os dados obtidos neste estudo revelam elevada frequência, carga viral e variabilidade genética de NoVs entre crianças atendidas em um hospital de Goiânia, Goiás. Os resultados são importantes para o melhor entendimento da epidemiologia dos NoVs em ambiente nosocomial, e poderão ser úteis como informação no advento do desenvolvimento de uma vacina eficaz. A determinação da carga viral de NoV em

amostras de *swab* nasal é um dado novo, podendo este contribuir para a elucidação de uma possível rota alternativa de transmissão dos NoV.

Palavras-chave: Norovírus, Crianças, Ambiente nosocomial, Gastroenterite viral, Swab nasal, Carga viral.

ABSTRACT

The norovirus (NoVs) are important viral causative agents of acute gastroenteritis (AGE), affecting individuals of all ages in distinct parts of the world; however, the highest morbi-mortality rates occur mainly in children under five years of age and the elderly. The aim of this study was to screening NoV by Polymerase Chain Reaction Post Reverse Transcription (RT-qPCR) and real-time (RT-qPCR) in fecal and nasal swab of children up to six years of age, with and without AGE symptoms. Samples were obtained at the Materno Infantil Hospital, from May/2014 to May/2015. Secretor status of children was also determined by enzyme immunoassay and genotyping (FUT2 gene) from the sediment of nasal swab epithelial cells. A global positivity index of 17% (37/219) for NoV in feces, and from these positive children, 48.6% (18/37) had AGE symptoms. Mean viral load in fecal samples was 2.59×10^{10} CG/g from symptomatic and 1.37×10^9 CG/g in asymptomatic. A higher positivity rate (70%) was observed GII NoV, compared to GI NoV (30%) and a higher positivity in children up to 24 month old (67.5%), although not statistically significant. As for the secretor status of children positive for NoV in fecal samples, 94.6% positive secretory status. The NoV were detected in practically every month of the study, and no particular pattern of circulation in relation to dry or rainy seasons was observed. Most children positive for NoV (70%) had the record they have received at least the first dose of the vaccine against Rotavirus, being the highest viral load detected among vaccinated children. The NoV RNA was detected in 8.7% of nasal swab samples of the children and of these, 58% had AGE symptoms. The mean viral load in *swab* samples from symptomatic children was 2.10×10^8 and in the asymptomatic children was 2.41×10^7 CG/mL. A high NoV genotype variability was found in the study (GI.2, GI.3, GI.5, GII.3, GII.4 and GII.6), with a predominance of GII.4 (28.6%), with this being the first report of NoV GI.5 in Brazil. The data obtained in this study reveal a high frequency, viral load, and genetic variability of NoVs among children attended in a hospital of Goiânia, Goiás. The results are important for a better understanding of NoV epidemiology in nosocomial environment, and may constitute useful information on the advent of the development of an effective vaccine. The viral load in nasal swab samples is a novel data that may contribute for the elucidation of a possible alternative route of NoV transmission.

Keywords: Norovirus, Children, Nosocomial environment, Viral gastroenteritis, Nasal swab, Viral load

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 HISTÓRICO

Em 1929, foi reportado um surto de gastroenterite aguda (GEA), cujas manifestações clínicas predominantes dos envolvidos eram vômito, diarreia e cólicas abdominais, sendo esta doença designada *winter vomiting disease* (síndrome do vômito de inverno-SVI) por Zahorsky. Entretanto, o agente etiológico do surto permaneceu desconhecido por vários anos (Zahorsky 1929, apud Kapikian 2000).

Estudos realizados nas décadas de 1940 e 1950 utilizando voluntários humanos que receberam inóculos livres de bactéria, oriundos de indivíduos apresentando a SVI, permitiram a reprodução dos sintomas clínicos pelos voluntários, demonstrando que partículas filtráveis poderiam ser os agentes etiológicos dessa doença. Durante este período, tentativas de identificação dos agentes causais da SVI foram realizadas. Finalmente, em 1972, partículas virais estruturadas, pequenas e arredondadas (*small round structured particles*) foram observadas por microscopia eletrônica (ME), a partir de amostras fecais provenientes de um surto de GEA acometendo crianças de uma escola de ensino primário na cidade de Norwalk, Ohio, nos Estados Unidos (Kapikian 2000).

A associação destas partículas com a doença (SVI) foi confirmada por imunomicroscopia eletrônica (IME), através da demonstração de que anticorpos de soro de pacientes na fase de convalescência reagiam com as partículas presentes nas amostras fecais. Essas foram então denominadas de *Norwalk virus* (NV), em referência à cidade onde foram inicialmente detectadas (Kapikian 1972).

Após a descoberta do NV, outras variantes virais como o *Hawaii virus* (HV), descoberto a partir de um surto ocorrido em uma família em Honolulu, Havaí, EUA em 1971 e o *Snow Mountain virus* (SMV), proveniente de um surto ocorrido em um resort no Colorado, EUA em 1976, foram descritas em 1977 e 1982, respectivamente (Thornhill et al. 1977, Dolin et al. 1982).

Na década de 1980, novos estudos com voluntários humanos foram realizados a fim de se estudar a relação antigênica entre as variantes virais, por meio de ensaios de inoculação e desafio, que permitiram avaliar a existência de proteção homóloga e/ou cruzada em voluntários desafiados com diferentes filtrados provenientes de indivíduos envolvidos em surtos de GEA (Green 2013). Em 1990, através de técnicas

de clonagem, reação em cadeia pela polimerase pós transcrição reversa (RT-PCR) e sequenciamento genômico, foi possível uma melhor caracterização das variantes virais, levando ao sequenciamento do genoma completo do NV, bem como a um grande avanço no entendimento da epidemiologia molecular dos outros calicivírus humanos (HuCV) descobertos posteriormente (Xi et al. 1990).

1.2 PROPRIEDADES GERAIS

1.2.1 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO

Quando descobertos, em 1972, os HuCV foram classificados na família *Picornaviridae*, devido à semelhança morfológica observada por ME entre as partículas de NV e os vírus já classificados na referida família. Posteriormente, a presença de uma única proteína estrutural foi reportada como uma característica que diferenciava os HuCV dos outros membros da família *Picornaviridae*, assim, em 1979 houve a designação de uma nova família, *Caliciviridae*, pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (Matthews 1979, Green et al. 2000).

A família *Caliciviridae* é constituída por cinco gêneros: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Nebovirus*, *Vesivirus* e *Lagovirus* (ICTV 2014), sendo que cinco novos gêneros (*Bavovirus*, *Nacovirus*, *Recovirus*, *Valovirus*, e *Secalivirus*) foram recentemente propostos (Oka et al. 2015). Os *Norovirus* e *Sapovirus* são vírus conhecidamente patogênicos para os humanos, entretanto, algumas variantes classificadas nestes gêneros infectam também animais como bovinos, suínos, murinos entre outros. Os vírus pertencentes aos outros três gêneros da família *Caliciviridae* infectam exclusivamente animais. Os *Lagovirus* receberam este nome por infectar lagomorfos, os *Vesivirus* por causar lesões vesiculares e os *Nebovirus* pela localização geográfica onde foi encontrado (Newbury, Inglaterra) e por infectar bovinos (Oliver et al. 2006, Green 2013, ICTV 2014).

O NV é considerado o protótipo do gênero *Norovirus* (NoV), no qual outros vírus com características semelhantes vêm sendo classificados, sendo nomeados de acordo com seu local e ano de descoberta (ICTV, 2014). O gênero *Norovirus* subdivide-se em pelo menos seis genogrupos (GI-VI), sendo o GVII recentemente proposto (Tse et al. 2012). Esta subclassificação tem sido realizada com base na semelhança da sequência genômica do gene que codifica para a proteína VP1.

Os genogrupos são ainda ser subdivididos em genótipos, considerando uma similaridade de mais de 85% na sequência genômica completa do gene que codifica a

proteína VP1 (Zheng et al 2006) e, até o momento, foram identificados aproximadamente 38 genótipos, nove classificados em GI, 21 em GII, três em GIII, dois em GIV, um em GV e dois em GVI. Os vírus dos genogrupos GI, GII e GIV infectam humanos, embora vírus do GII genótipo 11 infectem suíno e do GIV genótipo 2 infectam caninos. Os vírus classificados nos genogrupos GIII, GV e GVI infectam bovinos, murinos e caninos, respectivamente (Kroneman et al. 2011).

1.2.2 ESTRUTURA MORFOLÓGICA, GENÔMICA E PROTEICA

As partículas de NoV não apresentam envelope, possuem um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica e aproximadamente 30 nanômetros (nm) de diâmetro (**Figura 1**). O genoma viral é composto de RNA fita simples polaridade positiva e o capsídeo viral é composto, predominantemente, pela proteína VP1 e algumas cópias da proteína VP2 (Glass et al. 2000, Green et al. 2013).

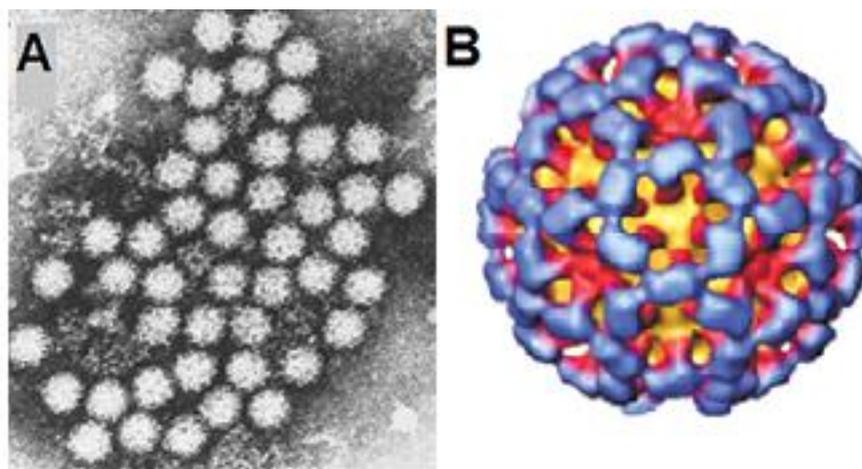


Figura 1: Micrografia eletrônica de partículas de NoV (A) e representação esquemática da partícula viral (B) de NoV. **Fonte:** Glass et al. 2000; Kapikian 2000; Atmar & Estes 2001, com adaptações.

O genoma dos NoVs possui comprimento de cerca de 7,3 a 8,5 Kilobases (Kb) e é composto por três regiões de leitura aberta (RLA) (**Figura 2**). A primeira região de leitura aberta é situada na extremidade 5', representando cerca de dois terços do genoma e codifica uma poliproteína de cerca de 200 kilodaltons (kDa) (Jiang et al. 1993).

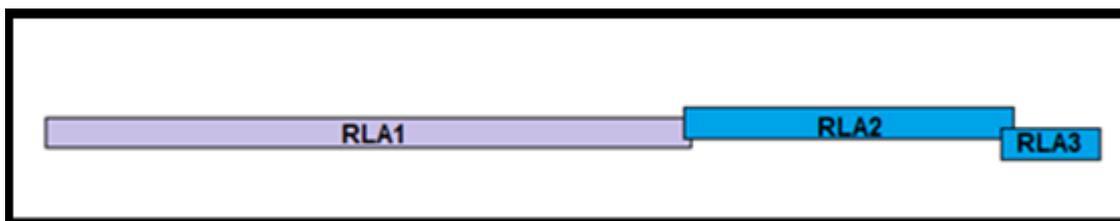


Figura 2: Representação da organização genômica de NoV. **Fonte:** Green 2013, com adaptações.

A clivagem da poliproteína codificada pela RLA 1, resulta nas proteínas não estruturais: NS1, NS2, NS3, NS4, NS5, NS6 e NS7, todas provavelmente envolvidas no processo de replicação viral. Entretanto, somente as funções de NS3, NS5, NS6 e NS7 são bem conhecidas: NTPase (nucleosídeo trifosfatase), VPg (proteína viral ligada ao genoma), Pro (proteínase) e RNA polimerase RNA dependente, respectivamente (Jiang et al. 1993, Belliot et al. 2003, Sosnovtsev et al. 2006). As outras proteínas não estruturais não têm suas funções ainda bem definidas, como a NS2, que parece interagir com o regulador de proteína SNARE (*soluble NSF attachment receptor*) de vesículas de membrana associada à proteína A (VAP-A), desempenhando papel na fusão das vesículas mediadas por SNARE, regulando assim a disponibilidade de ancoragem e fusão. Portanto, visto que a replicação do RNA acontece nas membranas intracelulares, NS2 poderia ter papel em ancorar complexos de replicação a membranas celulares (Hardy 2005).

A RLA2 e a RLA3 codificam proteínas estruturais, VP1 e VP2, respectivamente (Green 2013). A morfologia icosaédrica do vírion é conferida pela montagem das proteínas estruturais, VP1 e VP2. A proteína VP1 predomina no capsídeo viral, que é constituído por 180 moléculas desta proteína que são organizadas em 90 dímeros, sendo a automontagem do capsídeo viral independente de RNA ou da proteína VP2. Esta proteína possui dois domínios: o domínio *shell* (S) e o domínio *protruding* (P) (Prasad et al. 1999, Vongpunsawad et al. 2013).

O domínio S é a estrutura que circunda o RNA e confere a morfologia icosaédrica ao vírion, sendo considerada a região mais conservada da proteína. O domínio P se projeta e forma as protuberâncias características em forma de cálice, que motivou a utilização do termo *Caliciviridae* para a denominação desses vírus. Este domínio P é subdividido em dois subdomínios, P1 e P2, sendo o último o mais variável (Prasad et al. 1999, Bertolotti-Ciarlet et al. 2003, Green 2007). O subdomínio P2 parece estar envolvido na interação patógeno-hospedeiro, pois algumas variantes de NoV, é

capaz de se ligar os antígenos do grupo sanguíneo humano, que são reconhecidos como potenciais receptores e/ou co-receptores que estariam envolvidos na susceptibilidade e resistência a infecção por estes agentes (Matsui & Greenberg 2000, Glass et al. 2009, Li et al. 2012).

A proteína VP2 é a menor das proteínas estruturais e sua função não foi ainda completamente esclarecida. Sabe-se que sua presença aumenta a eficiência da expressão de VP1, bem como a estabilidade das partículas produzidas (Jiang et al. 1993, Glass et al. 2000). A proteína VPg apesar de estar presente na estrutura do vírion, ligada covalentemente ao genoma, está envolvida no processo de transcrição e replicação (Sosnovtsev & Green 2000, Green 2013).

1.2.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Os NoV são ácido-resistentes, o que se reflete na sua estabilidade ao passarem pelo estômago e permanecerem infecciosos ao chegarem às vilosidades intestinais (Green 2007).

Anteriormente, acreditava-se que as partículas virais seriam resistentes ao tratamento com cloro em concentrações inferiores a 300 mg/L. (Duizer et al. 2004). No entanto, em estudo mais recente, no qual o tratamento com cloro demonstrou maior eficácia em comparação a outros sanitizantes químicos como o dióxido de cloro, ácido peracético, peróxido de hidrogênio e o fosfato trisódico, a concentração de 189 mg/L foi eficiente na redução da infecciosidade do vírus (Kingsley et al. 2014). Entretanto, na portaria nº 2914 de 2011 do Ministério da Saúde recomenda-se que o teor residual de cloro na água esteja entre 0,2 mg/L e 2 mg/L, concentrações insuficientes para inativar partículas de NoV em caso de contaminação (Brasil 2011).

Os NoV permanecem infecciosos por até 28 dias a 20° C em condições ambientais, sendo inativados pelo calor numa temperatura de 63° C por 30 minutos ou de 70° C por 2 minutos, temperaturas geralmente utilizadas para a pasteurização de laticínios, e ainda por radiação ultravioleta (UV), com comprimento de onda (λ) entre 280-300 nm (Duizer et al. 2004).

Estudos realizados com os protótipos calicivírus felino (FVC) e calicivírus canino (CaCV) revelaram que estes foram sensíveis ao potencial hidrogeniônico (pH) abaixo de 3,0 e acima de 9,0, sendo inativados completamente em pH 2,0 por 30

minutos, no entanto, o norovírus murino (MuNoV) apresenta resistência à inativação em pH entre 2,0-10,0 (Cannon et al. 2006).

Deve-se ressaltar que, devido à dificuldade no estabelecimento de um sistema rotineiro de cultura de células para a replicação dos NoV humanos, a maioria dos dados obtidos se referem a estudos realizados com *surrogates*, ou “substitutos” de NoV, de modo a inferir sobre as características biológicas e propriedades de inativação do vírus, utilizando principalmente calicivírus (CV) animais como FVC e MuNoV que são cultiváveis (Duizer et al. 2004, Straub et al. 2007).

Porém deve-se ter cuidado ao aplicar as informações sobre os CV animais aos NoV, pois estudos demonstraram que os FVC e MuNoV não são as variantes mais resistentes à inativação (Park et al 2006, Wang et al. 2012). Como por exemplo, apesar de soluções de etanol em diferentes concentrações serem capazes de reduzir a infecciosidade do MuNoV e FVC em alguns estudos (Macinga et al. 2008, Shimizu-Onda et al. 2013), isto não se aplicaria aos NoV humanos que mesmo após ao tratamento com etanol a 70% permanecem infecciosos (Liu et al. 2010).

1.3 PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A patogênese dos NoVs ainda não está totalmente elucidada devido, em parte, à dificuldade de cultivo destes agentes *in vitro* (Duizer et al. 2004).

As ferramentas moleculares vêm sendo utilizadas com a finalidade de se estabelecer uma forma de cultivo dos NoVs como é o caso do estudo de Chang e colaboradores (2006), que reportaram o desenvolvimento de células que expressam RNA de NV auto-replicantes (*replicons*), em culturas de células de humanos (Huh-7) e de hamster. A expressão dos *replicons* de NoV foi significativamente reduzida na presença de interferon alfa (IFN- α) de forma dose-dependente, sugerindo um papel da imunidade inata no controle da replicação NoV.

Estudos com voluntários humanos e modelos experimentais animais tais como os porcos gnotobióticos, bezerros, macacos e chipanzés (Kapikian 2000, Rockx 2005, Cheetham 2006, Souza et al. 2008, Bok 2011), têm sido utilizados na tentativa de uma melhor compreensão da patogênese viral (Green 2013). Dados recentes relatam a replicação de NoV em células B, utilizando-se da bactéria *Enterobacter cloacae* como uma possível fonte de receptores (antígenos de grupo sanguíneo humano - AGSH) para ligação do vírus, ou mesmo um co-fator necessário para a replicação viral. A replicação

foi observada tanto *in vivo* quanto *in vitro*, dados esses que podem contribuir para o estabelecimento de um sistema de replicação eficiente para NoV em um futuro próximo (Jones et al. 2014).

Os NoVs são transmitidos pela via fecal-oral, através do contato pessoa-a-pessoa, ingestão de água ou alimentos contaminados ou através de fômites (Green 2013). A transmissão pela ingestão de partículas aerossolizadas, provenientes de vômito também é admitida (Chadwick & MacCann 1994, Marks et al. 2003; O'Neill & Marks 2005, Lopman et al. 2011). Recentemente foi especulada a transmissão pela via respiratória, em razão da detecção de RNA viral em amostras de *swab* respiratório de três crianças com sintomas respiratórios por RT-PCR em tempo-real (RT-qPCR). Entretanto à ocasião, a carga viral das amostras não foi reportada (Esposito et al. 2014).

A associação de certos genótipos de NoV a determinadas formas de transmissão tem sido demonstrada. Como por exemplo, Vega et al. (2014) que analisaram o perfil de circulação dos NoV nos Estados Unidos de 2009 a 2013, demonstrou que a variante GII.4 estava mais associada a transmissão pessoa-a-pessoa, especialmente em instituições de cuidados prolongados, como os asilos, bem como os ambientes hospitalares, enquanto que as variantes GI.7 e GII.12 foram mais frequentemente associadas a surtos por consumo de alimentos contaminados.

Acredita-se que a dose infecciosa para o estabelecimento de infecção por NoV seja baixa, cerca de 20 partículas virais (Teunis et al. 2008, CDC 2011). O período de incubação é curto, em média de 12 a 48 horas e os principais sintomas associados à infecção são diarreia, vômito, náusea, dores abdominais, febre, mialgia, cefalia e calafrios, sendo a doença geralmente autolimitada na maioria dos indivíduos imunocompetentes (Hutson et al. 2004, Koopmans 2008, Pringle et al. 2015). Entretanto, em indivíduos imunocomprometidos a excreção viral e os sintomas podem durar meses podendo estes indivíduos constituírem uma fonte de disseminação viral, principalmente em ambiente nosocomial (Siebenga et al. 2008, Morter et al. 2011, Lemes et al. 2014).

Estudos histopatológicos de biópsias provenientes de modelos animais infectados com NoVs humanos (Cheetham et al. 2006, Souza et al. 2008) e de voluntários humanos (Schreiber et al. 1974) revelaram que as células-alvo da replicação seriam as células maduras das vilosidades intestinais da porção superior do intestino delgado. No entanto, sucessivas falhas em cultivar NoV em sistemas de cultura

baseados em células epiteliais intestinais *in vitro*, levantou a questão se essas células seriam mesmo o alvo de replicação viral (Karst et al. 2014).

Foi recentemente especulado que o principal alvo de replicação dos NoVs seriam células do sistema imune, tais como as células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais presentes na mucosa do intestino delgado (Karst et al. 2014). Estudos em modelos animais, utilizando o MuNoV e NoVs humanos, (Wobus et al. 2004, Mumphrey et al. 2007, Lay et al. 2010, Chan et al. 2011, Bok et al. 2011, Jones et al. 2014) demonstraram que as prováveis células alvo de NoV são células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Entretanto, deve-se se atentar ao fato de que esses dados não excluem a possibilidade destes vírus se replicarem em outras células *in vivo*, tais como as células maduras das vilosidades intestinais (Karst et al. 2014). Por outro lado, apesar de vários estudos, o receptor viral permanece ainda desconhecido, sendo os antígenos de grupo sanguíneo humanos (AGSH) considerados receptores/co-receptores putativos (Shirato 2011).

Biópsias do intestino de indivíduos infectados por NoV revelaram uma desorganização das células epiteliais do jejuno, infiltrados de células mononucleares, vacuolização do citoplasma e achatamento das vilosidades. As atividades enzimáticas da fosfatase alcalina e trealase foram reduzidas durante o período sintomático. Também foi observada a má absorção de d-xylose, gorduras e lactose. Tem sido proposto que a motilidade gástrica mais lenta do que o normal, bem como a demora no esvaziamento gástrico seriam os responsáveis pela náusea e vômito associados à doença por NoV (Meeroff et al. 1980, Glass et al. 2009, Green, 2013).

Atmar et al. (2008) realizaram um ensaio clínico com voluntários humanos utilizando NV e constataram a excreção viral em picos, com uma mediana de quatro dias após a inoculação independente da manifestação de sintomas. Os participantes infectados começaram a excretar partículas virais nas fezes uma média de dezoito horas após a inoculação, sendo que o pico de excreção viral ocorreu dentro de quatro dias, no qual a sintomatologia de 69% dos voluntários tinha se resolvido. A excreção viral prolongada, bem como a detecção de RNA de NoV no soro sugerem que possa haver um sítio de persistência viral ou mesmo de replicação fora do intestino (Iwakiri et al. 2009, Medici et al. 2010, Fumian et al. 2013, Lemes et al. 2014, Esposito et al. 2014). Estudo recente reportou também a positividade para NoV em amostras de secreções respiratórias de crianças que apresentavam sintomas respiratórios, e mais tardiamente vômito, febre e diarreia (Esposito et al. 2014).

1.4 SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA

Como referido, o receptor celular para NoV não foi ainda totalmente elucidado, mas desde a década de 1990, ferramentas moleculares como as VLPs tem sido aplicadas em ensaios de ligação com as células de mucosa, demonstrando assim que algumas amostras virais, como os vírus pertencentes ao GI.1 têm a propriedade de ligar-se aos antígenos de grupo sanguíneo humano (AGSH) na superfície de células de mucosas. Essas moléculas funcionariam, portanto, como prováveis receptores e/ou co-receptores para a infecção por NoV, portanto, este mecanismo seria considerado fator de susceptibilidade/ resistência de indivíduos à infecção por NoV (Green 2013).

Os AGSHs são glicanos complexos que são expressos na superfície das células vermelhas do sangue, mas também nas mucosas do intestino e epitélio respiratório, sendo ainda secretados nestes locais, como na saliva e fluido duodenal (Marionneau et al. 2002, Shirato 2011). A capacidade dos NoVs de se ligarem aos AGSHs é dependente de resíduos específicos no domínio P2 da proteína VP1 do capsídeo (Cao et al. 2007).

A expressão de AGSH é controlada por vários genes que influenciam as vias biossintéticas que conduzem aos fenótipos ABO, Lewis e fator secretor. Os genes FUT2 e FUT3 codificam as enzimas que glicosilam de forma sequencial os diferentes precursores desses antígenos e a presença ou ausência desses genes poderia, portanto, determinar se o indivíduo será susceptível ou resistente a NoV de forma variante-específica (Lindesmith et al. 2003, Le Pendu et al. 2006, Fernández & Gomes 2010).

Os indivíduos secretores positivos (Se+) são aqueles que possuem a capacidade de expressar os AGSH na superfície das mucosas e estes seriam mais suscetíveis à infecção e geralmente esta capacidade é atribuída ao gene FUT 2, sendo as mutações silenciadoras desse gene responsáveis pelo fenótipo não-secretor (Se-), onde 95% das mutações encontradas seria a mutação G428A (Marionneau et al. 2002). Estima-se que cerca de 20% da população mundial seja não-secretora (Rydell et al. 2011). No Brasil, somente dois estudos até o momento (Vicentini et al. 2013, Lemes et al. 2014) avaliaram o *status* secretor de indivíduos infectados ou não por NoV, não

sendo ainda portanto, muito bem definido o percentual de indivíduos secretores da população.

Estudos com o objetivo de avaliar os fatores associados à susceptibilidade/resistência têm sido realizados utilizando os vírus NV e NoV GII.4, a fim de tentar estabelecer a relação entre os antígenos AGSH e as infecções por estes vírus. Existem, portanto três categorias de padrões de ligação de NoV-AGSH: os que ligam nos epítomos A/B e H, aqueles que se ligam aos epítomos de Lewis e H e aqueles que não se ligam a nenhum AGSH conhecido. O vírus GI.1 está vinculado à ligação aos epítomos H tipo 1, Lewis b e os grupos sanguíneos O, A e AB, não se ligando ao grupo sanguíneo do tipo B (Hutson 2002, Lindesmith et al. 2003, Chen et al. 2004, Bucardo et al. 2009, Tan et al. 2009, Bull et al. 2011).

Os vírus do GII possuem um espectro mais amplo de afinidade, sendo capazes de se ligar a mais tipos de AGSH do que os vírus GI.1, o que pode ajudar a explicar a sua maior prevalência em humanos (Bucardo et al. 2009, Tan et al. 2009, Bull et al. 2011). Por exemplo, os vírus GII.4 identificados mais recentemente ligam-se a ambos epítomos antigênicos A e B, e em adição à Lewis (Lindesmith et al. 2008). Esta capacidade de se ligar com múltiplos AGSH pode aumentar a população suscetível à infecção (Lindesmith et al. 2008, Bok et al. 2009). A hipótese seria de que os AGSH podem exercer importante pressão seletiva na evolução de NoV e seleção de variantes predominantes (Tan et al. 2009).

Vale ressaltar que a variabilidade viral existente para NoV reflete também no sítio de ligação da proteína VP1 com os AGSH, pois cada variante tem um padrão de ligação aos antígenos, ou seja, não somente a disponibilidade dos antígenos caracterizam algum fator de susceptibilidade, mas também se há a possibilidade de interação necessária para que a ligação seja possível (Ramani et al. 2014).

Portanto, a susceptibilidade a NoV parece ser multifatorial, uma vez que ter *status* secretor positivo parece não ser a única condição para que o indivíduo seja infectado. Acredita-se ainda que diferentes NoV também possam utilizar diferentes receptores/co-receptores para entrar na célula-alvo, uma vez que indivíduos não-secretores não estão completamente imunes a infecção por NoV (Murakami et al. 2013). Além disso, a rápida evolução de NoV tem gerado novas variantes epidêmicas, que podem expressar diferentes padrões antigênicos, resultando em amostras possivelmente mais virulentas (Huang et al. 2003, Debbink et al. 2012, Frenck et al. 2012).

Em relação aos mecanismos de resistência, Lindesmith et al. (2003) sugerem que haja dois: a resistência genética pela inativação do gene FUT2 e outra caracterizada pela imunidade adquirida através da rápida produção de IgA específica ao NV em alguns indivíduos secretores positivos. No entanto, devido a grande variabilidade dos diferentes genótipos do NoV, se fazem necessários estudos adicionais com o propósito de estabelecer melhor as interações complexas das diferentes variantes virais com esses antígenos (Estes et al. 2006).

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

As técnicas de ME ou IME foram inicialmente utilizadas para a identificação de NoV em amostras de surtos de GEA, entretanto, existem algumas dificuldades na sua utilização, como a baixa sensibilidade, a necessidade em se concentrar o material por ultracentrifugação e a utilização de pessoal e equipamentos especializados na sua execução (Pang & Lee 2015).

A natureza fastidiosa dos NoV não permite o cultivo *in vitro* rotineiro, com exceção do MuNoV, por isso a principal fonte de partículas virais para o desenvolvimento de métodos diagnósticos tem sido amostras de fezes de indivíduos infectados com NoVs na fase aguda e os soros hiperimunes dos mesmos na fase convalescente da infecção. Isso possibilitou o desenvolvimento de algumas ferramentas de diagnóstico além da ME como Radioimunoensaio (RIA), EIE e *Western Blot*, que podem ser utilizados para detectar a presença de antígenos virais nas fezes de indivíduos infectados ou de anticorpos no soro (Kapikian 2000, Atmar & Estes 2001).

O sequenciamento do genoma completo do NV em 1990 foi determinante para o desenvolvimento de novos métodos de diagnósticos. Com o desenvolvimento das VLPs foi possível ainda produção de anticorpos poli- e monoclonais que podem ser utilizados em ensaios imunoenzimáticos para a detecção do antígeno viral (proteína VP1 do capsídeo) nas fezes. As VLPs podem também ser utilizadas para detecção de anticorpos produzidos em resposta a infecção por esses vírus (Atmar & Estes 2001).

Os imunoenaios para a detecção de NoV têm sido desenvolvidos empregando-se anti-soros hiperimunes preparados contra VLPs recombinantes (rVLPs). Embora sejam bastante sensíveis, os anticorpos utilizados nestes ensaios são altamente específicos para a VLP utilizada na imunização do animal nos quais foram produzidos, portanto, como os NoV são geneticamente e antigenicamente variáveis não é possível a detecção de todas as variantes virais. Progresso tem sido feito no desenvolvimento de

rVLPs de NoV que permitem o desenvolvimento de anticorpos que reagem com diferentes variantes do vírus, podendo ser empregados em ensaios imunoenzimáticos (EIE) para pesquisa de antígenos virais em espécimes clínicos e para triagem em surtos epidêmicos (Jiang et al. 2000, Lindesmith et al. 2012).

O EIE com rVLP de NV para pesquisa de anticorpos tem demonstrado detectar respostas de anticorpos amplamente reativos em voluntários que receberam os vírus NV, Hawaii, Snow Mountain, embora a resposta máxima foi observada em voluntários desafiados com NV (Green et al. 1993, Monroe et al. 1993, Treanor et al. 1993, Graham et al. 1994). Assim, é impossível identificar a variante antigênica de NoV por sorologia devido a reação cruzada dos anticorpos por EIE (Noel et al. 1997a). Além disso, a diversidade antigênica dos NoV constitui um desafio para o desenvolvimento de um EIE específico e sensível ao mesmo tempo (Belliot et al. 2003, Duizer et al. 2007).

Uma alternativa para a rápida detecção de NoV são os ensaios imunocromatográficos que juntamente com os EIEs podem ser utilizados como testes de triagens em surtos de GEAs. Entretanto, estes possuem uma sensibilidade que varia de 17 a 90% (Kim et al. 2012, Ambert-Balay & Pothier 2013).

Desta forma, os métodos moleculares são considerados os métodos de escolha para a pesquisa e caracterização dos NoVs. Dentre estes, considera-se a reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR), Multiplex RT-PCR e RT-qPCR (RT-PCR quantitativo ou PCR em tempo real). Com estes métodos, os NoV podem ser detectados em espécimes clínicos (fezes ou vômito), alimentos e água contaminados e fômites (Vinjé et al. 2001, Atmar & Estes 2001, Pang & Lee 2015).

Há várias considerações para um bom desempenho da técnica de RT-PCR. Em primeiro lugar, o procedimento de extração de RNA viral deve permitir a purificação de um RNA viral íntegro e livre de inibidores de reação. Controles internos de RNA devem ser usados nos ensaios de amostras clínicas ou ambiental a fim de evitar resultados falsos positivos. Em segundo lugar, a escolha dos pares de iniciadores é fundamental, pois existe uma considerável diversidade genômica entre as variantes em circulação (Vinjé 2014). Diferentes pares de iniciadores têm sido descritos, com base em regiões parciais do genoma de NoV altamente conservadas, como a região codificante para a RNA polimerase viral, quando objetiva-se apenas detectar o genoma viral, ou de regiões variáveis, como as junções entre capsídeo e polimerase ou P2 hipervariável, quando o objetivo é de se avaliar a variabilidade genética. RT-PCR seguido do sequenciamento genômico tem sido o método de escolha para a detecção e

caracterização de NoV em surtos (Vinjé et al. 2003, Kageyama et al. 2003, Atmar et al. 2011).

Para a caracterização molecular de NoV tem sido utilizada diferentes regiões alvo do genoma viral: A, B, C, D e E (**Figura 3**). Entretanto, a avaliação da diversidade genética não é possível através das porções mais conservadas das regiões A e B, por isso, iniciadores têm sido desenvolvidos a partir das regiões C e D, que tem como alvo a proteína VP1, que confere variabilidade aos NoV, sendo que o sequenciamento da região D é mais utilizada na diferenciação dos isolados, pois NoV de um mesmo genótipo podem exibir variações distintas (Kojima et al. 2002, Vennema et al. 2002, Vinjé et al. 2004, CDC 2011, Vega et al. 2011).

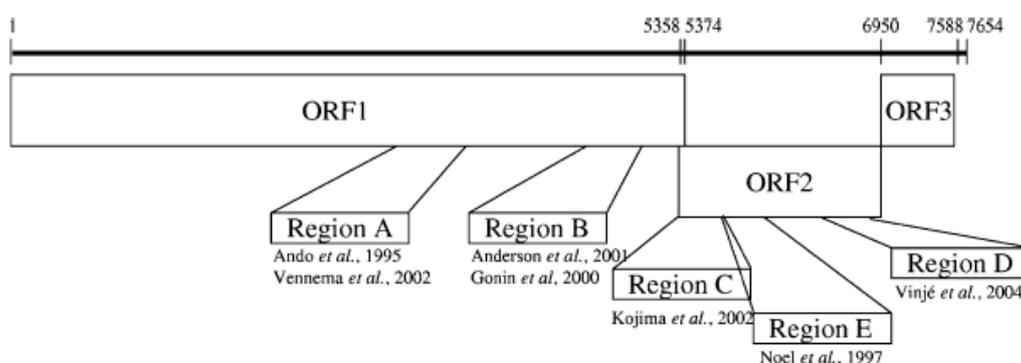


Figura 3: Representação esquemática das regiões alvo para detecção do genoma viral. **Fonte:** Salts et al. 2012, com modificações.

A utilização do RT-qPCR tem vantagens como permitir rápida detecção, determinação do número de cópia genômicas virais, além de minimizar os riscos de contaminação entre amostras (Schultz et al. 2011, Hellberg et al. 2014), bem como os erros devido a manipulação de produtos de PCR. Ensaios de um único passo de RT-qPCR, em que tanto a transcrição reversa e amplificação de cDNA são realizadas numa única reação, diminuem ainda mais o risco de contaminação cruzada (Vinjé 2014). Tem sido reportado que pacientes com maior carga viral inicial excretam partículas por mais tempo, entretanto os estudos são poucos e ainda controversos. Tem sido também sugerido que vírus do GII sejam excretados em quantidades mais elevadas, quando comparados aos do GI (Chan et al. 2006, Rolfe et al. 2007, Miura et al. 2013).

Além das metodologias acima citadas, nos últimos anos várias plataformas de diagnóstico múltiplo de GEAs diferentes têm sido desenvolvidas para a detecção simultânea de vírus entéricos, bactérias e parasitos. O xTAG GPP (Luminex

Corporation, EUA) e FilmArray® Painel GI (BIOFIRE Diagnostics Inc., EUA), foram recentemente aprovados pela FDA, que liberou para uso a versão do xTAG GPP que detecta e identifica simultaneamente NoV GI e GII, rotavírus grupo A, sete bactérias e dois parasitas (Navidad et al. 2013), enquanto o Painel de GI FilmArray detecta 23 patógenos entéricos, incluindo NoV GI e GII, rotavírus grupo A, adenovírus espécie F, SaV, astrovírus, 14 bactérias e quatro parasitos. Ambas as plataformas são capazes de distinguir entre NoV GI e GII. O xTAG GPP pode completar o teste de 24 amostras no prazo de cinco horas, mas isso não inclui preparação e extração das amostras. Em contraste, o sistema FilmArray permite a liberação de resultados dentro de uma hora. Entretanto, uma desvantagem do sistema FilmArray é que apenas poucas amostras podem ser processadas de uma só vez, além do elevado custo do ensaio (Khare et al. 2014, Vinjé 2014).

1.6 EPIDEMIOLOGIA

Os NoV são uma das causas mais reportadas de surtos de GEA tanto em população adulta como pediátrica em vários países do mundo (Glass et al. 2009). Uma revisão sistemática de todos os estudos que utilizaram a técnica de RT-PCR para a detecção de NoV, atribuiu a estes agentes de 5-31% de todos os casos de GEA em pacientes hospitalizados e 5-36% dos casos de todos os pacientes que procuram a atendimento ambulatorial por apresentarem GEA (Patel et al 2009, Rha et al. 2013). O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos EUA estima que NoV sejam responsáveis, anualmente, por 60% dos casos de gastroenterite aguda (com causa conhecida), ou 21 milhões de casos, nos Estados Unidos.

A população em geral é amplamente vulnerável à GEA por NoV, mas os maiores índices de morbi-mortalidade ocorrem nos extremos de idade (Robilotti et al 2015). Estudo realizado em 2014 identificou NoV como o agente causador mais comum de GEA esporádica, utilizando como método diagnóstico o RT-PCR multiplex, tendo como alvo diferentes regiões do genoma viral. (Pang et al. 2014).

Em um estudo com crianças finlandesas que desenvolveram GEA esporádica e que estavam sendo monitoradas como parte de um ensaio clínico de uma vacina contra os rotavírus, NoV foram detectados em 20% das amostras fecais das crianças que receberam placebo e em 22% dos receptores da vacina, tornando-o o segundo vírus mais frequentemente detectados em pacientes com GEA (Pang et al. 1999). Dados da Tailândia (Malasao et al. 2008), Malawi (Dove et al. 2005), Chile

(O’Ryan et al. 2009), e da Índia (Monica et al. 2007) confirmam NoV como uma comum (frequentemente a primeira ou segunda) causa de GEA esporádica entre crianças. Um estudo de vigilância epidemiológica de cinco anos realizado em Melbourne, Austrália, com crianças de cinco anos de idade, demonstrou que os índices de positividade para HuCV durante o período de estudo foi de 9,2% (113/1.233), com 95% das variantes pertencentes ao gênero *Norovirus* (Kirkwood et al. 2005).

Um estudo de vigilância de populações pediátricas conduzido em três hospitais com atendimento pediátrico, geograficamente distantes, nos EUA revelou uma taxa de positividade para HuCV de 8,5% em crianças com GEA, sendo a grande maioria (84%) por NoV (Zintz et al. 2005).

Algumas variantes de NoV, tem predominado em surtos epidêmicos desde 2002. Os NoV GII, e especificamente GII.4, tem sido o genótipo mais predominantemente detectado em surtos por NoV no mundo, pelo menos durante a última década (Lindell et al. 2005, Zheng et al. 2010, Matthews et al. 2012, Bernard et al. 2014). Novas variantes de GII.4 têm substituído as variantes anteriores a cada 2-3 anos, e tem sido associado com um aumento de casos de NoV sendo a maioria variantes de GII.4 (Lopman et al. 2004, Hasing et al. 2013, Fonager et al. 2013). Por exemplo, a variante de GII.4 95 / 96_US foi associada ao aumento da frequência de NoV em cinco continentes (Noel et al. 1999).

Entretanto, outras variantes de GII.4 circulam amplamente, mas em baixas frequências, como Japan_2001 e Henry_2001 (Siebenga et al. 2007). Isolados do GII.4 são uma causa comum de surtos de GEA em serviços de saúde, incluindo hospitais e instituições de cuidados de longo prazo, como os asilos (Vega et al. 2014, Maunula et al. 2005, Zheng et al. 2010, Haising et al. 2013, Koopmans 2009, Sakon et al. 2007).

Tem sido reportado que algumas variantes GII.4 podem estar associadas a sintomas mais graves, como o aumento de náuseas, vômitos, cólicas abdominais e febre quando comparado aos sintomas causados por variantes não-GII.4 (Lai et al. 2013, Svraka et al. 2007, Mai et al. 2013, Friesema et al 2009). Segundo a literatura, esses dados devem ser interpretados com cautela, pois a maioria desses estudos foram realizados em apenas alguns países, ademais, estudos em outros locais, têm demonstrado a emergência e predominância de circulação de outras variantes virais como a GII.6, GI.10, dentre outras (Chhabra et al. 2009, de Oliveira et al. 2013, Moyo et al. 2014, Wu et al. 2014).

Esposito et al. (2014) avaliaram 562 amostras de *swab* nasofaríngeano de crianças admitidas em um hospital apresentando quadro clínico semelhante a gripe. Para determinar a positividade para NoV foi utilizada a metodologia de RT-qPCR, após a prévia triagem dessas amostras por painel de vírus respiratório para que somente amostras negativas para estes fossem testadas. Ao todo, três amostras foram positivas (0,5%), sendo todas elas pertencentes ao genótipo GII.4. Além disso, os autores afirmam que os dados mostram que os NoVs podem ser encontrados no trato respiratório secreções de crianças com sintomas respiratórios e que esses sintomas respiratórios poderiam preceder as manifestações gastrointestinais (Esposito et al. 2014).

No quadro 1, estão relacionadas características de alguns estudos conduzidos em população pediátrica, sendo evidenciada uma grande variabilidade nos índices de detecção dos NoVs. A variabilidade das metodologias de diagnóstico e detecção viral, bem como diferenças no delineamento dos estudos podem ser fatores que contribuem com essa divergência, embora a localização geográfica possa ser outro fator contribuinte.

Quadro 1. Características de diferentes estudos de detecção e caracterização molecular de NoV em crianças, conduzidos em diversos países.

Autor, Ano, País	Nº amostral	Material clínico	Faixa etária	Metodologia de detecção	Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR (região alvo do genoma viral)	Índice global de detecção	Genótipo encontrado
Hansman et al. 2004, Tailândia	105	Fezes	≤5 anos	RT-PCR	COG1F/ G1SKR G2F3/ G2SKR SV5317/ SV5749 (RNA polimerase /capsídeo)	12%	NoV – GI.3, GI.8, GI.9, GII.1, GII.3, GII.?
Borges et al. 2006, Brasil	1006	Fezes e <i>swab</i> retal	<5anos	RT-PCR	Ni/E3, JV12/13, 289/290 (RNA polimerase)	8,6%	NR
Soares et al. 2007, Brasil	289	Fezes	≤ 10 anos	RT-qPCR	ND	14,5%	GI, GII
Andreasi et al. 2008, Brasil	406	Fezes	<3 anos	RT-PCR	Ni/E3, JV12/13, 289/290 (RNA polimerase RNA dependente)	7,6%	NR
Puustinen et al. 2011, Finlândia	4727	Fezes	Até 3 anos	RT-PCR	NVp69 Np36 JV21, JV24 (RNA polimerase/capsídeo)	25%	GII.4, GI.6, GI.4, GII.9,GI.2, GIU, GIId,
Goméz-Santiago et al. 2012, México	414	Fezes	Até 5 anos	RT-PCR	ND	32%	NoV – GII.4 e GII.2

ND – Não disponível; NR – Não realizado.

Quadro 1. Características de diferentes estudos de detecção e caracterização molecular de NoV em crianças, conduzidos em diversos países – Continuação.

Autor, Ano, País	Nº amostral	Material clínico	Faixa etária	Metodologia de detecção	Iniciadores utilizados	Índice global de infecção	Caracterização molecular
Aragão et al. 2013, Brazil	159	Fezes	Até 10 anos	EIA/ RT-PCR	p289/p290, Mon 431/434 (RNA polimerase/capsídeo)	22,2%	NoV - GII.4, GII.6, GII.7, GII.17, GI.2
de Oliveira et al. 2013, Brasil	56	Fezes	< 6 anos	RT-PCR	GISKF, GISKR, GIISKF e GIISKR	23,2%	NoV – GI.1, GII.4, GI.7, GII.6, GII.1, GII.2
Ren et al. 2013, China	500	Fezes	<5 anos	RT-PCR	ND	29,14%	NoV - GII.4, GII.6, GII.2, GII.3 e GII.7 SaV – GI.1, GI.2 e GII.1
Vicentini et al. 2013, Brazil	397	Fezes	Até 11 anos	RT-PCR	MON 431/433 MON 432/434, SRI-1/SRI-2, MON381/MON383 G1SKF/G1SKR G2SKF/G2SKR (RNA polimerase/ capsídeo)	4%	GII, GI
Bicer et al. 2014, Turquia	520	Fezes	<16 anos	Ensaio imunocromatográfico Comercial	-	9,8%	-
Bucardo et al. 2014, Nicaragua	330	Fezes	< 5 anos	RT-qPCR	NVG1f1b, NVG1rlux, NVG2flux1 COG2R CUSVF1, CUSVF2 CUSVR (RNA polimerase/ capsídeo)	41%	NoV - GII.4, GII.não4, GI.3, GI.2
Moyo et al. 2014, Tanzania	1266	Fezes	<2 anos	RT-qPCR	COG1F/ COG1R COG2Fex/ COG2R (capsídeo)	14,3%	GII.4, GII.16, GII.21, GII.g, GII.13, GII.e, GI.5, GI.7

ND – Não disponível; NR – Não realizado.

Além de casos esporádicos de gastroenterite aguda, surtos por NoV têm sido reportados em diferentes partes do mundo (Patel et al. 2009, CDC 2011). Na Catalunia, Espanha, Dominguez et al. (2008), no período de outubro de 2004 a outubro de 2005, analisaram um total de 534 amostras de fezes provenientes de 62 prováveis surtos de gastroenterite viral, onde 52% (278/534) das amostras foram positivas para NoV, sendo este identificado como único agente causador em 51 surtos durante o período do estudo. Na França, Belliot et al. (2010) analisaram 316 surtos, que ocorreram no período de setembro de 2007 a março de 2009. Nesses surtos, 1.422 amostras de fezes foram coletadas e testadas, e dos 316 surtos, 254 foram atribuídos ao NoV. Em Singapura, Ho et al. (2014) investigaram surtos ocorridos simultaneamente em dois acampamentos militares, utilizando amostras de fezes, e o índice de positividade encontrado para NoV foi de 34,1% (70/205), sendo a maioria pertencente ao GI.

Em Goiânia, GO, de Oliveira et al. (2013) monitoraram a ocorrência de HuCV em uma creche durante dois anos, bem como realizaram a caracterização molecular das amostras positivas. Nesse estudo, foi encontrado um índice de positividade de 8% (43/539) para NoV, com índice de positividade significativo em amostras de crianças assintomáticas. Ademais, grande variabilidade de genótipos: GII.6, GII.2, GII.1, GI.7, GII.4, e GI.1.

Diante do exposto, acredita-se que determinadas características biológicas de NoVs, bem como determinados aspectos da patogenia viral, como a baixa dose infecciosa, elevada estabilidade em condições ambientais e resistência a inativação, o número de partículas excretados nas fezes, que pode ser elevado, bem como a excreção prolongada, em alguns casos, sejam fatores que contribuam para a rápida disseminação dos NoV, principalmente em ambientes semi-fechados e com aglomeração de pessoas, tais como hospitais, escolas, restaurantes, creches e navios de cruzeiro, resultando na ocorrência de surtos, mas também de casos esporádicos na comunidade (Caul 1994, Marks et al. 2003, Koopmans & Duizer, 2004, CDC 2011).

1.7 TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE

A infecção por NoV induz a uma gastroenterite que é em geral autolimitada. Embora não muito frequentes, complicações como desidratação grave por NoV podem ocorrer, neste caso o tratamento recomendado é o de suporte com reposição oral de líquido e eletrólitos. Administração parenteral de fluídos pode ser necessária no caso de vômitos e/ou diarreia severa (CDC 2011). Embora a infecção por NoV seja

considerada de curta duração, achados demonstraram que a duração pode ser prolongada em pacientes imunocomprometidos (Chang & George 2007, Lemes et al. 2014), podendo nestes pacientes a infecção contribuir para um pior prognóstico (Schwartz et al. 2011).

Embora antivirais específicos para o tratamento da infecção por NoV ainda não estejam disponíveis, protocolos de tratamentos para outros agentes patogênicos, foram avaliadas em um pequeno número de indivíduos com norovirose, com diferentes taxas de sucesso, como o uso do composto nitazoxanida em pacientes sem nenhuma outra doença existente, que contribuiu com a redução do tempo de duração dos sintomas (Rossignol & El-Gohary 2006).

Esforços para desenvolver antivirais que tenham como alvo os estágios específicos do ciclo de replicação dos NoV estão em curso, mas a sua segurança e eficácia clínica não foi ainda estabelecida (Rocha-Pereira et al. 2010, Kim et al. 2011, Kankanamalage et al. 2015, Vashist et al. 2015). Diante da falta de um antiviral específico para o tratamento de NoV, as vacinas seriam a solução para o problema, no entanto, fatores como a alta variabilidade dos vírus bem como a ausência de um modelo de cultivo para a replicação em grande escala e evidências de imunidade protetora de média a curta duração dificultam a produção de uma vacina imunogênica e eficaz. Estudos vêm sendo realizados para o desenvolvimento de vacinas, entretanto, ainda não existe nenhuma vacina licenciada para uso (Green 2013, Debbink et al. 2014).

Portanto, medidas de prevenção e controle da infecção por NoV são atualmente a única forma de se tentar evitar a disseminação do vírus, não há métodos específicos de prevenção para NoV, somente medidas de contenção utilizadas nos casos de surtos a doenças infecciosas, como políticas de quarentena e manuseio dos pacientes doentes, lavagem das mãos e descontaminação eficaz do ambiente. Além disso, é preciso se atentar ao consumo de água tratada e alimentos devidamente processados, a fim de se evitar a contaminação por NoV através de água e alimentos (Albers 2004, CDC 2011, MacCannel et al. 2011).

A política de manejo dos pacientes doentes se resume no cuidado para que estes não se tornem fontes de disseminação para os demais saudáveis e também aqueles que se encontram debilitados por outras doenças. O treinamento da equipe de atendimento à saúde, bem como os visitantes é de extrema importância para que eles não se tornem carreadores dos vírus para os outros pacientes e também não se infectem. Para isso, medidas simples como a higienização das mãos por 20 segundos com a água e

sabão reduz o número de partículas por remoção mecânica (MacCannel et al. 2011, Barclay et al. 2014). O uso de desinfetantes a base de álcoois desmostram eficácia controversa na redução da carga viral em pesquisas experimentais (Sickbert-Bennett et al. 2005, Macinga et al. 2008, Park et al. 2010, Bolton et al. 2013).

Medidas como o isolamento e agrupamento de pacientes com base nos sintomas apresentados também são estratégias recomendadas para o controle da infecção em hospitais (CDC 2011, New Zealand Ministry of Health 2009, HPA - UK 2012, NDSC - Ireland 2004). Estas estratégias podem prevenir uma transmissão secundária, pois visam limitar a circulação viral no ambiente e, além disso, diminuir a duração do surto (Cheng et al. 2006, Wadl et al. 2010, Vinnard et al. 2012).

Outra medida que deve ser adotada é a descontaminação ambiental, o que não é tão simples de se conseguir devido à alta estabilidade de NoV no ambiente, uma grande parte das evidências sobre a desinfecção do ambiente é derivada de estudos utilizando FCV ou outros vírus *surrogates*, mas correlação direta com o sucesso na desinfecção de todos os NoV ainda é desconhecido (Barclay et al. 2014). Em geral, soluções de hipoclorito de pelo menos 1.000 ppm são os preferidos para a descontaminação de superfícies e objetos e deve ser utilizado por um tempo de contato adequado. Compostos de amônio quaternário, também estão sob investigação, mas têm sido pouco eficazes em comparação com soluções a base de hipoclorito de sódio (Bolton et al. 2013).

Tanto o tipo de agente inativante bem como o método de aplicação pode ter um impacto sobre o sucesso na desinfecção. Em ambientes nosocomiais, os estudos se concentraram na limpeza de superfícies de alto toque, tais como os banheiros do doente, mesas, cadeiras, computadores e cômodas, além de pisos e carpetes (Barclay et al. 2014). Passos adicionais, como descartar todos os itens não utilizados de atendimento ao paciente após a alta de um paciente infectado por NoV, têm sido descritos, entretanto a correlação direta dessas medidas com a redução da duração dos surtos nosocomiais, não foi ainda estabelecida (Barker et al. 2004, Jimenez & Chiang 2006, CDC 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Estima-se que ocorram anualmente cerca de 1,45 milhões de mortes relacionadas à gastroenterite aguda no mundo (Ahmed et al. 2014), constituindo uma das principais causas de morbi-mortalidade em crianças (WHO 2014). Uma revisão sistemática recente realizada por pesquisadores do CDC estimou que NoVs sejam responsáveis por 18% de todos os casos de gastroenterite aguda no mundo (Ahmed et al. 2014). Estudos recentes têm sugerido que os índices de positividade para NoVs tenham aumentado significativamente, principalmente após a implementação, em vários países, das vacinas contra rotavírus (Zeng et al. 2010, Payne et al. 2013, Mast et al. 2015).

A patogenia e suscetibilidade/resistência aos NoVs ainda não estão bem definidos sendo relevante a pesquisa de fatores que possam contribuir para um melhor entendimento desses aspectos, como exemplo a associação entre a susceptibilidade à infecção por NoV com AGSH (*status* secretor) (Shirato et al. 2011). Estudo realizado no Laboratório de Virologia Humana do IPTSP, demonstrou a presença prolongada de RNA viral no sangue e excreção crônica viral nas fezes de indivíduos transplantados (Lemes et al. 2014), corroborando outros estudos que têm sugerido a existência de um possível sítio de persistência viral no organismo (Medici et al. 2010, Esposito et al. 2014). Foi ainda reportada a detecção de RNA de NoV em amostras do trato respiratório de crianças com sintomas respiratórios (Esposito et al. 2014), sendo portanto relevante a pesquisa de NoV em diferentes amostras clínicas, além de fezes de indivíduos infectados.

Os NoVs são associados a surtos de GEA em ambientes semi-fechados como os hospitais. Um genótipo em particular, GII.4, é o mais encontrado em ambiente nosocomial (Iturriza-Gómarra & Lopman 2014). A excreção viral prolongada em pacientes imunocomprometidos tem sido documentada e associada à disseminação dos NoVs nesse ambiente, bem como a um possível pior prognóstico para os pacientes (Doshi et al. 2013, Ye et al. 2015).

Deste modo, torna-se importante a determinação da carga viral de indivíduos infectados, de diferentes populações, a fim de auxiliar no esclarecimento da correlação entre carga viral e patogenia, fornecendo assim informações que contribuam para um melhor entendimento do papel desses agentes na etiologia das GEA. Além disso, demonstrar que a rápida identificação de surtos nessas instituições é necessária,

como medida de prevenção e controle para evitar a disseminação viral a pacientes muitas vezes já imunocomprometidos. Portanto, são de grande relevância estudos que avaliem a variabilidade genética de NoV, os fatores associados à susceptibilidade/resistência aos vírus, bem como a relação entre carga viral e sintomas clínicos.

3. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a ocorrência, a carga viral e perfil molecular de NoV, bem como o *status* secretor de crianças, com até seis anos de idade, com e sem sintomas de GEA atendidas em um hospital de referência em atendimento infantil de Goiânia, Goiás.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o índice de positividade de NoV em amostras clínicas (fezes e *swabs* nasais);
- Caracterizar molecularmente os NoVs detectados nas amostras clínicas;
- Determinar a carga viral em amostras clínicas (fezes e *swab*) e correlacionar com os sintomas apresentados pelas crianças;
- Identificar o *status* secretor das crianças participantes do estudo e associar com susceptibilidade/resistência a infecção por NoV.

4. METODOLOGIA

4.1. Local de estudo

O Hospital Materno Infantil (HMI) é um dos hospitais públicos de referência para o atendimento pediátrico em Goiás. Além do atendimento ambulatorial e de emergência oferece atendimento nas especialidades de pediatria, ginecologia e gestação de alto risco, sendo toda sua atenção voltada para mulheres e crianças.

4.2 Delineamento e População de estudo

Trata-se de um estudo observacional, de corte transversal para a pesquisa de NoV em amostras de fezes e *swab* nasal, obtidas por conveniência entre maio de 2014 a maio de 2015, de crianças com ou sem sintomas de gastroenterite aguda, atendidas no HMI, com até seis anos de idade. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (CAAE 37305314.7.0000.5078) (**Anexo 1**) e faz parte do monitoramento contínuo das gastroenterites virais na região Centro-Oeste, em diferentes populações, que vem sendo realizado desde a década de 1980 pelo Laboratório de Virologia/IPTSP/UFG.

Para a seleção das crianças, primeiro procedeu-se uma abordagem direta dos possíveis casos elegíveis. Os prontuários/fichas de avaliação clínica das crianças selecionadas foram avaliados pelo membro da equipe de pesquisa e para a definição de um quadro sintomático foram considerados os seguintes critérios: apresentação de sinais gastroentéricos (vômito e/ou diarreia com ou sem dores abdominais, com ou sem febre), sendo que estas crianças constituíram o primeiro grupo. O segundo grupo foi constituído de crianças que não se enquadraram nestes critérios, sendo que estas foram atendidas no hospital por algum outro motivo que não os sintomas gastroentéricos, como por exemplo, sintomatologia de outras doenças infecciosas, procedimentos cirúrgicos, doenças congênitas, entre outros.

Após identificação dos casos elegíveis, procedeu-se o recrutamento dos pacientes e esclarecimentos a respeito dos objetivos da pesquisa e metodologia de coleta de amostra. Em caso de consentimento foi obtida a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**TCLE – Anexo 1**) pelos pais ou responsáveis, e realizada entrevista para preenchimento do questionário contendo dados clínicos e epidemiológicos (**Anexo 2**). Um fluxograma da metodologia do estudo está representado na figura 4.

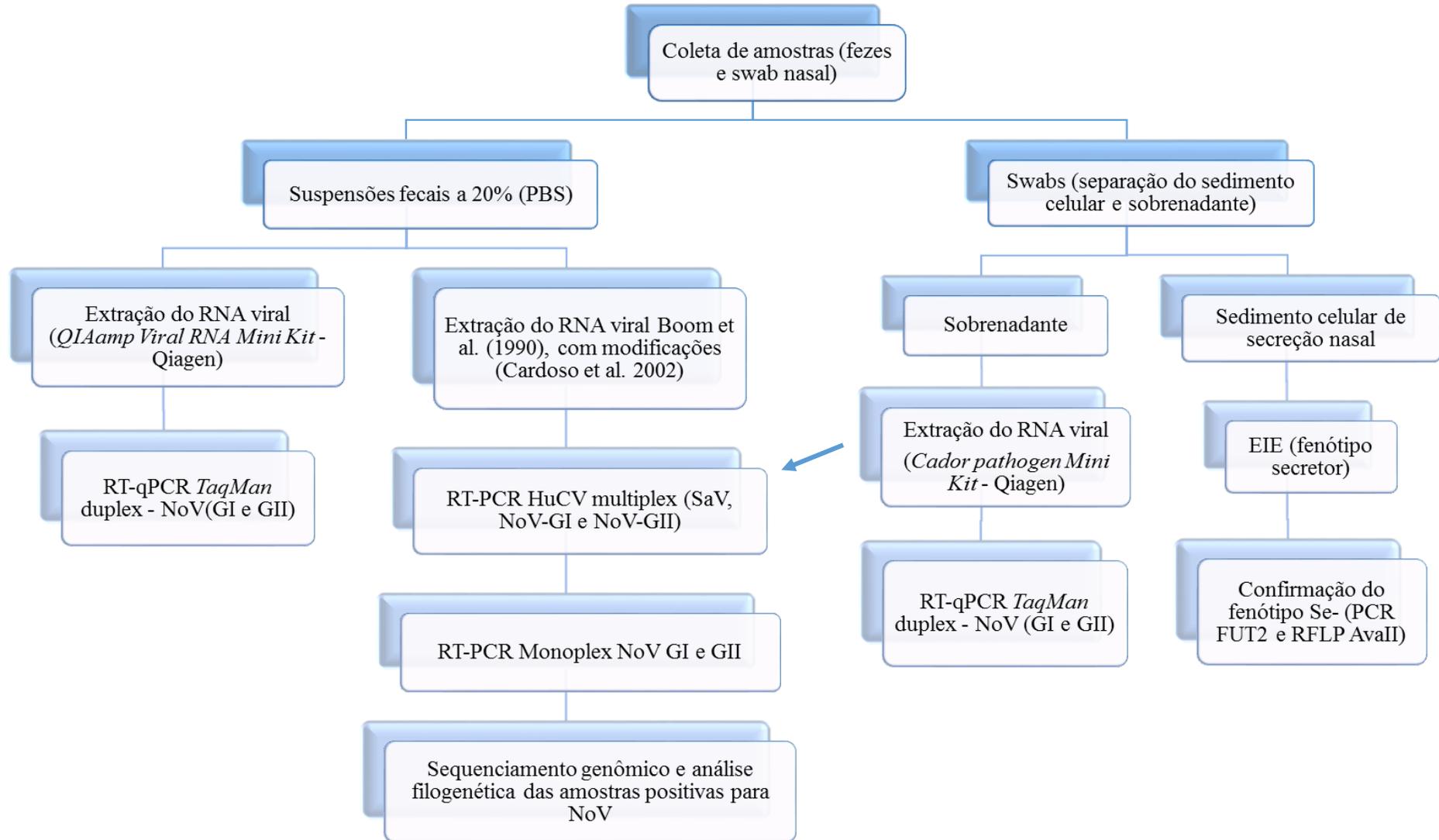


Figura 4: Fluxograma da metodologia do estudo.

4.3 Coleta e preparo das Amostras Clínicas (fezes e *swab* nasal)

Os *swabs* (FLOQSwabs, Copan, Brescia, Itália) nasais foram coletados conforme descrito por Lambert et al. (2008) e armazenados em tubo estéril contendo 2 mL de meio de transporte MEM (Meio Mínimo Essencial – Grand Island, USA). Após identificação o *swab* já no meio MEM foi homogeneizado em vórtex, em seguida, retirado do tubo, o qual foi centrifugado a 1300 x g, 10° C por dez minutos (Centrifuge Universal 320R – Hettich). O sobrenadante foi separado do sedimento celular e armazenado em criotubo à – 80°C até a realização dos ensaios moleculares. O sedimento celular também foi armazenado em microtubos de 0,5 mL a –80° C para realização dos ensaios de fenotipagem e genotipagem para determinação do *status* secretor das crianças participantes do estudo.

As amostras de fezes foram coletadas em frascos coletores estéreis e armazenadas a 4°C até serem transportadas para o Laboratório de Virologia/IPTSP/UFG, onde foram imediatamente processadas a fim de se obter uma suspensão fecal a 20% em tampão fosfato salina (PBS - cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio dibásico, fosfato monobásico de potássio, pH 7,4) e estocadas a -80°C, até a realização dos ensaios laboratoriais.

As amostras de fezes e *swab* foram preparadas separadamente em cabines com fluxo laminar e luz UV. As amostras de *swab* foram processadas e testadas separadamente das amostras de fezes, a fim de se evitar a contaminação cruzada.

4.4 Determinação do *status* secretor (antígeno H)

4.4.1 Fenotipagem do fator secretor (detecção do antígeno H-1)

A determinação do fenótipo secretor foi realizada através de ensaio imunoenzimático (EIE), utilizando a lectina-UEA (Ulex europaeus agglutinin – St Louis, MO, USA), que se liga de forma específica aos antígenos H-1, expressos nas mucosas e saliva, somente de indivíduos secretores, seguindo protocolo descrito por Nordgren et al. (2013) e modificado por Lemes et al. (2014).

De modo breve, os micropoços de uma placa de poliestireno (Santa Cruz Biotechnology – Santa Cruz, CA, USA) foram sensibilizados com 100 µL de células provenientes da secreção respiratória dos pacientes coletados através do *swab* nasal, uma amostra controle positivo e uma amostra controle negativo, previamente diluídas a

1:10 em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6). A placa foi então incubada por duas horas a 37°C, seguida de incubação *overnight* a 4°C. Na manhã, seguinte a placa foi lavada uma vez com PBS (pH 7,4) e bloqueada por uma hora com solução a 3% de albumina bovina em PBS (pH 7,4). Em seguida, foi adicionado 100 µL do conjugado (lectina-UEA-peroxidase), diluído a 1:1.500 em solução a 0,3% de albumina bovina em PBS. A placa foi então incubada por uma hora e meia a 37°C, seguida da adição da solução substrato (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio). A reação foi interrompida, após 30 minutos de incubação, pela adição de 100 µL da solução de parada (ácido sulfúrico a 1N), seguida de leitura visual e em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450/620-700 nm, sendo a intensidade da coloração diretamente proporcional à concentração de antígeno presente nas amostras.

Para definição do *cut-off* do EIE foi calculada a média de valores de absorvância de 5 controles negativos (0,076), sendo acrescido a este valor duas vezes o valor do desvio padrão (0,034), considerando uma margem de erro, superior e inferior, de 10%. Foram, portanto, consideradas amostras positivas (Se+) as que apresentaram absorvância acima do valor do *cut-off*, acrescido de 10%.

4.4.2 Confirmação do fenótipo Se-: genotipagem do gene FUT2

4.4.2.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de células presentes na amostra de secreção respiratória dos indivíduos caracterizados Se- pelo EIE, utilizando-se o reagente Brazol (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil). Foi adicionado a cada tubo plástico do tipo *ependorf* um volume de 200 µL de células suspensas em MEM e 600 µL do reagente Brazol. Os tubos foram homogeneizados por inversão, em seguida por 2 min em vórtex e adicionou-se 250 uL de clorofórmio (Merck - Darmstadt, Germany) gelado. Os tubos foram homogeneizados em vórtex por 1 min, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 20 min a 4°C (Micro High Speed Centrifuge, Vision Scientific). Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos contendo 500 uL de etanol P.A. (Merck – Darmstadt, Germany) gelado e homogeneizados por inversão manual por 2 min. Um novo passo de centrifugação foi realizado (10.000 x g por 15 min a 4°C), sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado com 500 uL de etanol 70% gelado. Os tubos foram homogeneizados e submetidos a centrifugação a 10.000 x g por

10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os tubos colocados para secar a temperatura ambiente e o pellet ressuspensão em 20 uL de água DEPC estéril.

4.4.2.2 PCR para amplificação do gene FUT2

A realização do PCR-FUT2 foi realizada conforme descrito por Svensson et al. (2000) e Lindesmith et al. (2003), com modificações. Para amplificação parcial do gene FUT2 foi utilizado o par de iniciadores sense GAGGAATACCGCCACATCCCGGGGAGTAC e antisense ATGGACCCCTACAAAGGTGCCCGGCCGGCT, com fragmento esperado de 195 pb. A reação foi realizada nas seguintes condições: 2,0 mM de cloreto de magnésio, 3,75 nmol de cada dNTP (Invitrogen – Foster City, CA, USA), 5 pmol de cada iniciador (Invitrogen – Foster City, CA, USA), tampão 10x da *Taq* DNA polimerase, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen – Foster City, CA, USA) e água estéril para completar volume final de 20 uL de reação. Para cada tubo contendo o mix foi acrescentado 5µL de DNA extraído (cerca de 500 µg) de cada paciente. As condições para a ciclagem programadas em termociclador *Swift*™ *Maxi* (Esco) foram às seguintes:

Desnaturação inicial:	94°C – 2 min	
Desnaturação:	94°C – 30 seg	} 5 ciclos
Anelamento:	68°C – 15 seg	
Extensão:	72°C – 30 seg	
Desnaturação:	94°C – 30 seg	} 20 ciclos
Anelamento:	64°C – 15 seg	
Extensão:	72°C – 45 seg	

4.4.2.3 Digestão com enzima de restrição

Para o ensaio de restrição foi preparada uma mistura contendo 1U da enzima de restrição Ava II (New England BioLabs - Ipswich, MA, USA) e 1,5 µL de tampão da enzima 10X, e água estéril para um volume total de 5 µL. Neste mix foram adicionados 10 µL de produto de PCR-FUT2 que foi submetido às seguintes condições

de incubação: 37° C por 90 minutos seguidos de 65° C por 20 minutos para inativação da enzima.

Dez microlitros do produto da digestão acrescidos de 2,0 µL do corante azul de bromofenol foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen -Foster City, USA) a 2,0% com brometo de etídio (0,1%) por aproximadamente 120 min a 100 volts em tampão TBE 0,5X (Tris/Borato/EDTA) e visualizados no Transiluminador Bio-rad modelo Universal Hood II. Após a reação de restrição, o genótipo secretor negativo foi caracterizado por dois fragmentos (um de 59 pb e o outro de 189 pb) para indivíduos de genótipo selvagem e somente um fragmento de 195pb para os indivíduos que possuem a mutação G428A.

4.5 Detecção e determinação da carga viral de NoV

4.5.1 Plasmídeo para realização do ensaio de RT-qPCR *TaqMan* duplex

Para obtenção da curva padrão a ser utilizada no ensaio de RT-qPCR *TaqMan* duplex foi realizada a clonagem, em plasmídeo, de insertos de NoV GI e NoV GII que foram amplificados e purificados de amostras previamente sequenciadas em estudos anteriores (Lemes et al. 2014, de Oliveira et al. 2013).

A clonagem foi realizada conforme descrito em Green & Sambrook (2012). As células competentes utilizadas foram cultivadas a partir de uma alíquota de célula competente *E. coli* da linhagem XL1Blue que foi gentilmente cedida pelo professor André Kipnis do Laboratório de Bacteriologia Molecular do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública.

Após a clonagem, estas bactérias foram propagadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido contendo ampicilina na concentração final de 100 µg/mL. As colônias isoladas foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) líquido, ao qual foi adicionado ampicilina na concentração final de 100 µg/mL. Um volume de 2 mL de bactérias em meio LB foi utilizado para a extração do DNA plasmidial pelo protocolo de lise alcalina (Green & Sambrook 2012) com posterior armazenamento a – 20 °C.

4.5.2 Curva padrão para o ensaio de RT-qPCR *TaqMan* duplex para NoV- GI e NoV-GII

A curva padrão da RT-qPCR *TaqMan* duplex foi construída a partir dos plasmídeos extraídos, linearizados e purificados. O DNA plasmidial purificado foi

quantificado por fluorometria utilizando o aparelho Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Após quantificação, foi realizado o cálculo para a equivalência de concentração em gramas para número estimado de moléculas de DNA. O tamanho total do inserto com o plasmídeo é de 3404 pb (NoV-GI), 3393 pb (NoV-GII). Para o cálculo do número de moléculas de DNA foi utilizado a seguinte fórmula:

$$[(Xg / \mu L \text{ DNA}) / (\text{tamanho do plasmídeo com inserto} \times 660)] \times 6.022 \times 10^{23} = Y \text{ moléculas}/\mu l$$

Após o cálculo, diluições seriadas na base 10 foram realizadas (10^9 a 10^{-1}) e testadas no aparelho *Rotor-Gene® Q 5plex HRM System* (Qiagen®), juntamente com amostras controles. A RT-qPCR *TaqMan* duplex NoV-GI/NoV-GII foi realizada de acordo com Schultz et al. (2011), com adaptações. Os iniciadores utilizados estão descritos no **quadro 2**. Foram utilizadas as diluições expressas em cópias genômicas por mililitro (CG/mL). A validação da curva foi obtida pelo coeficiente de correlação ($R > 0.99$) e o cálculo da eficiência. Em seguida, foram feitas alíquotas de cada diluição em microtubos de 200 μ L e congeladas a -80 °C.

Quadro 2 – Iniciadores e sondas utilizados no ensaio RT-qPCR *TaqMan* duplex NoV – GI e NoV - GII

	Nome	Sequência (5' – 3')	Sentido	Localização ^a
NoV GI	JJVMF	CCATGTTCCGTTGGATGC	Sense	5283 - 5300
	G1SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	Antisense	5358 – 5377
	RING1(c)	FAM ^b -AGATYGCGITCICCTGTCCA – BHQ ^d	Antisense	5321 - 5340
NoV GII	QNIF2	ATGTTTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA	Sense	5012 - 5037
	G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	Antisense	5367 – 5389
	QNIFS	VIC ^c -AGCACGTGGGAGGGCGATCGMG – BHQ ^d	Sense	5042 - 5061

Sequências de iniciadores descritas por Hill (2010). ^a – Localização genômica referente aos isolados Norwalk virus, NoV - GI (ID: M87661), Lordsdale virus (NoV - GII) (ID: X86557). ^b – sonda marcada com o fluoróforo FAM. ^c – Sonda marcada com o fluoróforo VIC. ^d – BHQ – *Black Hole Quencher*.

4.5.3 Determinação da carga viral de NoV nas amostras clínicas por RT-qPCR *TaqMan* duplex

4.5.3.1 - Extração do RNA viral da amostra fecal

A extração de RNA viral foi realizada a partir das suspensões fecais, utilizando-se o kit comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen - Hilden, Alemanha), seguindo instruções do fabricante. De modo breve, as amostras foram inicialmente incubadas a temperatura ambiente por dez minutos com o tampão de lise (560 µL do AVL) fornecidos pelo kit. Em seguida, foi adicionado 560µL de etanol absoluto às amostras, que foram aplicadas em colunas, e o lisado foi descartado por centrifugação. A etapa seguinte consistiu de sucessivas lavagens utilizando 500µL de cada tampão (AW1 e AW2) fornecido pelo kit. Em seguida foi adicionado, 60µL do tampão de eluição (AVE) e as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

4.5.3.2 Extração do RNA viral da amostra respiratória

O RNA viral foi extraído a partir de 200µL da amostra de *swab* processada utilizando o Kit *QIAamp® cadon® Pathogen Mini Kit* (Qiagen - Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. De modo resumido, as amostras foram tratadas com 20 µL de proteinase K com posterior homogeneização em vórtex. Adiciona-se 100 µL de tampão de lise (VXL com RNA carreador - 1 µg para cada 100 µL de VXL) e nova homogeneização. Em seguida o lisado foi transferido para mini-colunas fornecidas pelo kit. Posteriormente duas etapas de lavagem com tampões específicos (600 µL dos tampões AW1 e AW2) foram realizadas. Por fim, foi adicionado 150 µL do tampão de eluição (AVE) fornecido pelo kit foi utilizado e as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

4.5.3.3 RT-qPCR *TaqMan* duplex de NoV-GI e Nov-GII para determinação da carga viral

As amostras de fezes e *swab* nasal foram testadas separadamente por RT-qPCR *Taqman* duplex. Para verificação da presença de inibidores foi utilizado o Kit *TaqMan® Exogenous Internal Positive Control*. O ensaio de RT-qPCR *TaqMan* duplex foi realizado conforme descrito por Schultz et al. (2011), com adaptações. A reação consistiu de mix contendo 1X de Tampão *Path-IDtm multiplex One-Step RT-qPCR 2X* (Applied Biosystems – Carlsbad, CA, USA), 1X de *Multiplex Enzyme Mix 10X* e 0,9

μM de cada iniciador (**Quadro 2**) e $0,225 \mu\text{M}$ de cada sonda *TaqMan* (**Quadro 2**). O aparelho utilizado foi o *Rotor-Gene® Q 5plex HRM System* (Qiagen®), seguindo o seguinte protocolo de ciclagem:

Transcrição Reversa (RT): $50^{\circ}\text{C} - 10 \text{ min}$

Inativação da RT: $95^{\circ}\text{C} - 10 \text{ min}$

Desnaturação:	$95^{\circ}\text{C} - 15 \text{ seg}$	} 5 ciclos
Anelamento:	$50^{\circ}\text{C} - 1 \text{ min}$	
Extensão:	$60^{\circ}\text{C} - 1 \text{ min}$	
Desnaturação:	$95^{\circ}\text{C} - 15 \text{ seg}$	} 40 ciclos
Anelamento:	$55^{\circ}\text{C} - 1 \text{ min}$	
Extensão:	$65^{\circ}\text{C} - 32 \text{ seg}$	

Foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram *Cycle Threshold* (Ct) < 40 ciclos.

4.6 Detecção de NoV por RT- PCR HuCV multiplex convencional

4.6.1 Extração do RNA viral

A extração de RNA viral foi realizada a partir das suspensões fecais, utilizando-se o método de Boom et al. (1990), com modificações (Cardoso et al., 2002). Para extração do RNA viral das amostras fecais, foram utilizados $300\mu\text{L}$ da suspensão fecal acrescidos de $800\mu\text{L}$ de tampão L6 (Isotiocianato de guanidina, Tris/HCl, EDTA e Triton) e $20\mu\text{L}$ de Proteinase K. Após incubação a 56°C por 10 minutos, foram adicionados $200\mu\text{L}$ de etanol absoluto e $15\mu\text{L}$ de sílica, seguido de homogeneização por 15 minutos (em agitador Kline). O sedimento foi lavado, posteriormente, com tampão L2 (Isotiocianato de Guanidina, Tris-HCl), etanol a 70% e acetona P.A, seguindo-se uma nova incubação a 56°C por 15 minutos, e adição de $30\mu\text{L}$ de água DEPC, seguido de nova incubação, centrifugação por três minutos. Após este processo, $20\mu\text{L}$ do sobrenadante foi recolhido e submetido imediatamente à transcrição reversa para obtenção do cDNA viral.

4.6.2 RT-PCR multiplex para detecção de HuCV (NoV/SaV)

Para a pesquisa de ácido nucléico de NoV, a partir das amostras respiratórias e amostras fecais dos pacientes, foi utilizada a metodologia de multiplex RT-PCR para a síntese do cDNA seguida de amplificação. A transcrição reversa foi realizada com iniciador randômico pd(N)6 (Random Hexamer, Amersham Biosciences), seguindo-se a desnaturação (80°C/12min) e adição da mistura de reação para um volume final de 50µl (0,4mM de cada dNTP / 1X tampão de reação / 4mM MgCl₂ / 20U/µL inibidor de ribonuclease / 200U/µL Transcriptase Reversa – MMLV). A reação foi processada a 42°C por 60 minutos no termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal).

Para a amplificação, iniciadores específicos para segmentos da região de junção RLA 1 e 2 que codifica parte da RNA polimerase viral e a proteína VP1 do capsídeo de NoV dos genogrupos I e II (**Quadro 2**) e os iniciadores sense SaV124F GAYCASGCTCTCGCYACCTAC, SaV1F TGGGCCCTCGCCACCTAC e o iniciador antisense SaV1245R CCCTCCATYTTCAAACACTA (Oka et al. 2006) foram utilizados simultaneamente na reação, por meio de uma PCR multiplex. A reação foi constituída de 7 µL do cDNA acrescido de 18µL da mistura de reação para um volume final de 25 µL (1X tampão de reação / 1,5mM MgCl₂ / 0,4mM de cada dNTP / 1,5U/µL Taq DNA polimerase / 0,5µM de cada iniciador). A reação foi realizada em termociclador SwiftTM Maxi (Esco), nas seguintes condições:

Desnaturação inicial:	95°C – 5 min	
Desnaturação:	94°C – 15 seg	} 40 ciclos
Anelamento:	58°C – 1 min	
Extensão:	72°C – 1 min	
Extensão final:	72°C – 10 min	

Os produtos amplificados (389pb para GI e 378pb para GII) foram visualizados em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídio (0,1%) e comparados a um padrão de peso molecular (100pb, Jena Bioscience) em transiluminador de luz UV (Biorad). Para confirmação dos resultados foi realizado o RT-PCR monoplex com cada par de iniciador (NoV GI e NoV GII) em separado, seguindo as mesmas condições descritas para o RT-PCR multiplex.

4.7 Sequenciamento genômico e análise filogenética das amostras positivas para NoV

A reação de sequenciamento do fragmento parcial do genoma dos NoV (junção entre RLA1 e 2 e região C do capsídeo) foi realizada utilizando-se BigDye Terminator versão 3.01 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com os mesmos pares de iniciadores utilizados na reação de RT-qPCR (**Quadro 2**). Para cada reação de sequenciamento, empregou-se 3 ou 5 μL do DNA purificado, dependendo da concentração, e uma mistura contendo 3 ou 1 μL de água MilliQ, 2 μL de tampão 5X, 1 μL de primer (2 pmol) e 1 μL de Big Dye (o qual possui didesoxinucleotídeos trifosfatos (ddNTPs) com marcadores fluorescentes, dNTPs e Taq DNA polimerase). Posteriormente, as amostras foram levadas ao termociclador utilizando a ciclagem: 25 ciclos de 95°C por 20 segundos, 58°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

Em seguida, as amostras foram precipitadas utilizando isopropanol a 65% seguido de etanol a 60% para a retirada dos ddNTPs não incorporados. Após centrifugação, o etanol foi retirado e a placa colocada em termociclador para completa secagem (2 minutos a 95°C).

Adicionou-se 10 μL de formamida Hi Di (Applied Biosystems) às amostras, e a placa foi colocada em termociclador durante 5 minutos a 95°C para desnaturação da fita de DNA. Imediatamente após, as amostras foram colocadas em gelo por dois minutos, e a placa levada para o sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para a leitura dos eletroferogramas.

Para análise da qualidade das sequências obtidas montou-se uma sequência consenso das fitas sense e antisense utilizando a interface phred/phrap (Ewing et al. 1998, Gordon et al. 2001) por meio do site <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Posteriormente, foi feito o alinhamento das sequências consenso de cada amostra com a utilização do programa Clustal X (Thompson et al. 1997) juntamente com sequências protótipos de cada genótipo de NoV GI e GII obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para edição do alinhamento utilizou-se o programa BioEdit.

A árvore filogenética foi construída utilizando-se o programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 7.0 (Kumar et al. 2015). As análises foram realizadas pelo método Neighbor-Joining, modelo de substituição de nucleotídeos

Kimura 2 parâmetros e sendo consideradas 1000 replicatas e valores *boostraps* acima de 80%.

Adicionalmente, as sequências consensos obtidas também foram submetidas à análise pelo website *Norovirus Genotyping Toll* versão 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>), a fim de confirmar os resultados de genotipagem (Kroneman et al. 2011).

4.8 Análise estatística

A partir dos resultados moleculares e dados obtidos das fichas epidemiológicas dos pacientes foi realizada a análise estatística. Para esta análise, foi utilizado o programa IBM SPSS, versão 20.0, para análise univariada, como o teste de χ^2 , sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

Foram incluídas no estudo 219 crianças, das quais foram obtidas uma amostra de fezes e *swab* nasal de cada, entre maio/2014 a maio/2015. Os pacientes eram predominantemente do sexo masculino, 58,5% (128/219) e a idade das crianças variou de 0 a 70 meses, com média de 15 meses. Considerando os sintomas de GEA, 56% (123/219) das crianças foram incluídas no grupo sem sintomas de GEA e 44% (96/219) no grupo com sintomas de GEA (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Características gerais da população de estudo (N=219).

Características	N	%
Sexo		
Feminino	91	41,5
Masculino	128	58,5
Idade (meses)		
0 – 24	170	77,6
25 – 48	33	15,1
49 – 72	16	7,3
Sintomas GEA		
Sim	96	44
Não	123	56

Duas metodologias foram utilizadas na triagem das amostras de fezes e *swabs* nasais das 219 crianças participantes do estudo: RT-PCR convencional e o RT-qPCR *TaqMan* duplex. Dentre as 37 amostras de fezes positivas para NoV por RT-qPCR *TaqMan* duplex, 65% (24/37) foram positivos por RT-PCR convencional. E dentre as 19 amostras de *swab* nasal positivas para NoV por RT-qPCR *TaqMan* duplex, 42% (8/19) foram positivas por RT-PCR convencional (**Gráfico 1**). A carga viral nas amostras de fezes variou de $3,59 \times 10^6$ a $2,38 \times 10^{11}$ CG/g (média $2,59 \times 10^{10}$) nos paciente sintomáticos para GEA e de $2,79 \times 10^4$ a $1,46 \times 10^9$ CG/g (média $1,37 \times 10^9$) nos assintomáticos para GEA. Nas amostras de *swab* nasal, a carga viral nas crianças sintomáticas para GEA variou de $2,33 \times 10^6$ a $1,25 \times 10^9$ CG/mL, com média de $2,10 \times 10^8$ CG/mL, e nas assintomáticas para GEA de $4,22 \times 10^3$ a $1,77 \times 10^8$ CG/mL, com média de $2,41 \times 10^7$ CG/mL.

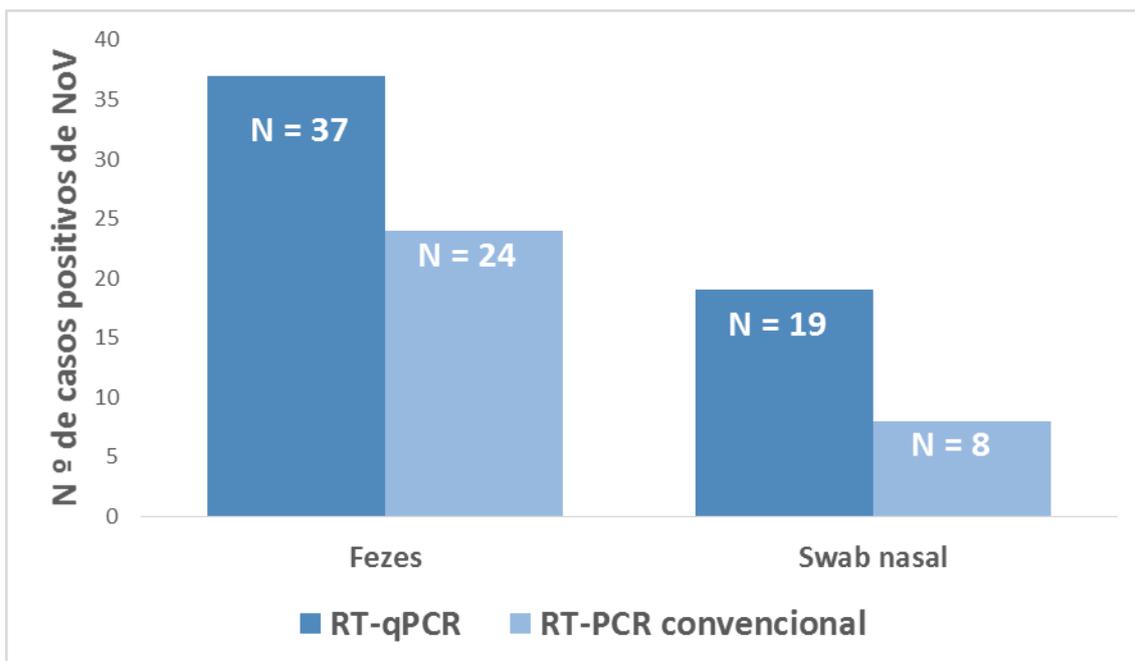


Gráfico 1- Número de casos positivos para NoV em relação às duas metodologias utilizadas (RT-qPCR TaqMan duplex e RT-PCR convencional).

Em apenas dois casos houve a identificação concomitante de NoV nas fezes e no *swab* nasal. A carga viral foi de $4,33 \times 10^7$ CG/g nas fezes e $1,77 \times 10^8$ CG/mL no *swab* nasal de uma criança e da outra a carga viral foi de $2,44 \times 10^9$ CG/g nas fezes e $7,91 \times 10^6$ CG/mL no *swab* nasal.

O índice de positividade para NoV nas fezes, considerando o método de RT-qPCR TaqMan duplex como padrão ouro de detecção, foi de 16,9% (37/219) (**Tabela 2**). Não foi observada nenhuma significância estatística entre a positividade para NoV nas fezes e as características sexo, idade, presença de sintomas, status secretor e vacina contra rotavírus do grupo A (RVA).

Tabela 2 – Análise univariada das características gerais das crianças em relação à positividade para NoV em amostras de fezes.

	Positivas/Total	(%)	OR* (IC 95%)**	p
Sexo				
Feminino	18/91	19,8	1,0	
Masculino	19/128	14,8	0,7 (0,34 – 1,43)	0,34
Idade (meses)				
49 – 72	3/16	18,8	1,0	
25 – 48	9/33	27,3	0,6 (0,37 - 7,07)	0,51
0 – 24	25/170	14,7	0,7 (0,19 - 2,81)	0,6
Presença de sintomas				
Não	19/123	15,5	1,0	
Sim	18/96	18,8	1,26 (0,62 – 2,56)	0,52
Sintomas				
Diarrea e febre	6/30	20	1,0	
Diarreia e vômito	1/2	50	4,0 (0,21 – 73,6)	0,35
Diarreia, febre, vômito	11/45	24,5	1,0 (0,4 – 3,9)	0,65
Diarreia, febre, vômito e dor abdominal	0/19			
Status secretor				
Se+	35/202	17,3	1,0	
Se -	2/17	11,8	1,6 (0,34 – 7,2)	0,6
Vacina RVA				
Não	11/63	17,5	1,0	
Sim	26/131	17,4	1,7 (0,54 – 2,55)	0,7
Sem informação	0/25			
TOTAL	37/219	(16,9)		

*OR: *odds ratio*; **IC: intervalo de confiança de 95%; RVA- rotavírus do grupo A.

Embora não estatisticamente significativo, foi observado maior índice de positividade dentre as crianças sintomáticas para GEA (18,8%) quando comparado com o grupo de crianças assintomáticas para GEA (15,4%). Dentre os pacientes sintomáticos, foi observado maior número de casos (61%) de pacientes que apresentaram três sintomas em associação (diarreia, febre e vômito) (**Gráfico 2**).

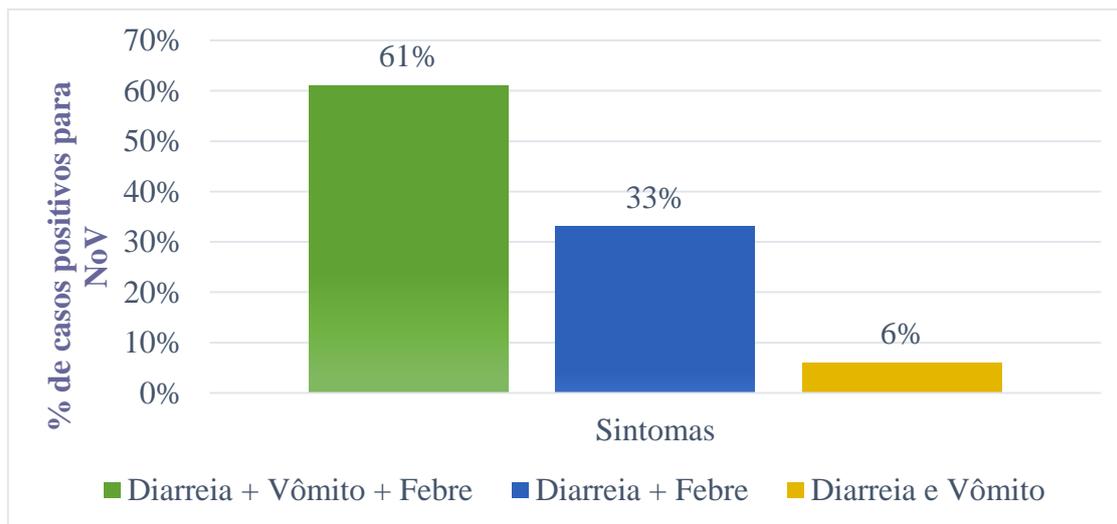


Gráfico 2 - Porcentagem de casos positivos para NoV em relação aos sintomas apresentados pelos pacientes.

Quanto a faixa etária, foi observado maior número de casos (25/37) de pacientes positivos para o NoV nas fezes que tinham idade até 24 meses, embora este dado não tenha sido estatisticamente significativo, como referido anteriormente. De forma semelhante, também foi observado maior número de paciente positivos para NoV com status secretor positivo (35/37), apesar de não ser estatisticamente significativo.

Dentre os genogrupos virais, observou-se maior positividade para NoV GII, 70% (26/37), quando comparado ao GI, 30% (11/37), sendo este dado estatisticamente significativo ($p < 0,05$). A carga viral nas amostras positivas para NoV GI variou de $2,79 \times 10^4$ a $2,38 \times 10^{11}$ CG/g, com média de $3,61 \times 10^{10}$ CG/g. Enquanto nos positivos para NoV GII variou de $7,53 \times 10^4$ a $2,79 \times 10^{10}$ CG/g, com média de $1,03 \times 10^{10}$ CG/g.

Considerando a circulação de NoV, durante o período de um ano (maio/2014 a abril/2015), em relação aos índices pluviométricos (mm^3) foi observado uma distribuição semelhante dos casos positivos para NoV durante as estações seca (maio a setembro) e chuvosa (outubro a abril) (**Gráfico 1**).

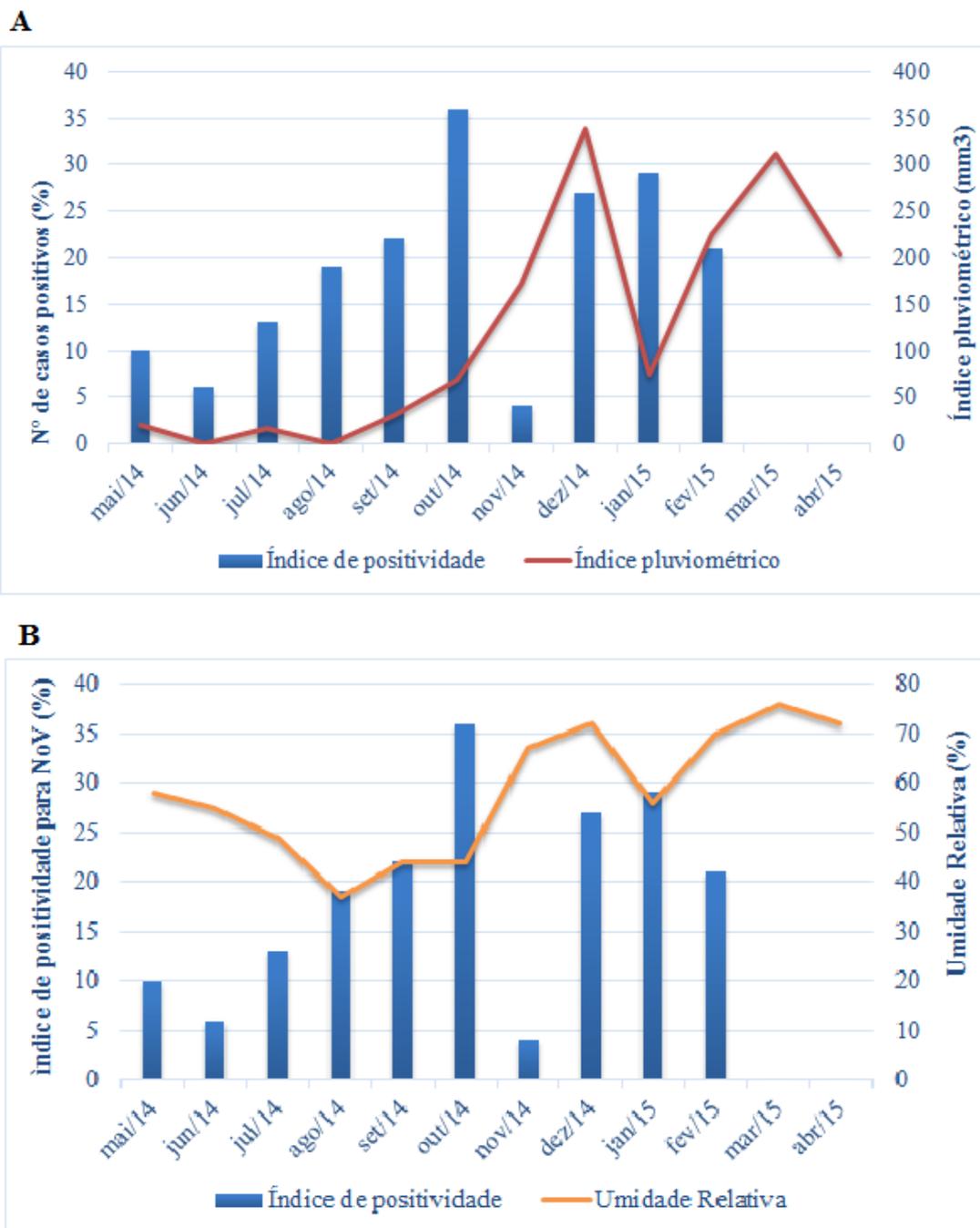


Figura 5- Índice de positividade para NoV em relação ao índice pluviométrico (mm³) (A) e a umidade relativa do ar (%) (B), considerando o período de um ano (maio/2014 a abril/2015).

Dentre os casos positivos, 70% (26/37) das crianças receberam pelo menos a primeira dose da vacina contra Rotavírus, enquanto 30% (11/37) das crianças não eram vacinadas. Quando se comparou a carga das crianças vacinadas e não vacinadas contra Rotavirus foi observada carga viral significativamente mais elevada nas crianças vacinadas ($p = 0,006$).

A positividade para NoV nas amostras de *swab* nasal foi de 8,7% (19/219), considerando o método de RT-qPCR TaqMan duplex como padrão ouro de detecção (**Tabela 3**). A carga viral nas amostras de *swab* das crianças sintomáticas variou de $2,33 \times 10^6$ a $1,25 \times 10^9$ CG/mL, com média de $2,10 \times 10^8$ CG/mL, e nas assintomáticas de $4,22 \times 10^3$ a $1,77 \times 10^8$ CG/mL, com média de $2,41 \times 10^7$ CG/mL. Também não foi observada nenhuma significância estatística quanto a positividade de NoV no *swab* nasal e as características sexo, idade, presença de sintomas, sintomas, status secretor e vacina contra RVA.

Tabela 3 – Análise univariada das características gerais das crianças em relação à positividade para NoV em amostras de *swab* nasal

	Positivas/Total	(%)	OR* (IC 95%)**	<i>p</i>
Sexo				
Feminino	10/91	11	1,0	
Masculino	9/128	7	0,61 (0,24 – 1,6)	0,30
Idade (meses)				
49 – 72	1/16	6,3	1,0	
25 – 48	2/33	6,1	0,7 (0,08 - ,6)	0,73
0 – 24	16/170	9,4	1,1 (0,54 - 2,19)	0,8
Presença de sintomas				
Não	8/123	6,5	1,0	
Sim	11/96	11,5	1,86 (0,72 – 4,82)	0,2
Sintomas				
Diarreia e febre	4/30	13,3	1,0	
Diarreia e vômito	1/2	50	0,15 (0,00 – 2,9)	0,2
Diarreia, febre e vômito	5/45	11,1	0,12 (0,0 – 2,32)	0,16
Diarreia, febre, vômito e dor abdominal	1/19			
Status secretor				
Se +	18/202	8,9	1,0	
Se -	1/17	6	1,56 (0,19 – 12,5)	0,67
Vacina RVA				
Não	7/63	11,1	1,0	
Sim	12/131	9,2	1,7 (0,54 – 2,55)	0,7
Sem informação	0/25			
TOTAL	19/219	(8,7)		

*OR: *odds ratio*; **IC: intervalo de confiança de 95%;

Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, foi observado maior índice de positividade dentre as crianças com sintomas de GEA, 11,4% (11/96), quando comparados as crianças assintomáticas para GEA, 6,5% (8/123). Dentre as

crianças com sintomas de GEA positivas para NoV no *swab* nasal, 46% (5/11) apresentaram febre, diarreia e vômito, 36% (4/11) apresentaram febre e diarreia, 9% (1/11) apresentaram vômito e diarreia e 9% (1/11) apresentaram febre, diarreia, vômito e dor abdominal.

Foi observado um maior número de casos positivos em crianças de até 24 meses de idade, 89% (17/19), entre pacientes que foram caracterizados como *status* secretor positivo, 94,7% (18/19), e dentre os pacientes com o registro de terem recebido pelo menos uma dose da vacina contra RVA, 63,1% (12/19), embora todos estes dados não tenha sido estatisticamente significativos, como referido anteriormente.

Considerando os genogrupos virais, diferentemente do que foi observada nas fezes, houve detecção homogênea entre os genogrupos GI e GII de NoV, 52% (10/19) NoV GII e 48% (9/19) NoV GI.

Dentre as amostras positivas para NoV, tanto no *swab* quanto nas fezes, 14 (13 de fezes e uma de *swab*) foram sequenciadas para a análise dos genótipos de NoV. Para realização da análise filogenética foram utilizadas sequencias protótipos bem como sequencias brasileiras (Lambden et al. 1993, Green et al. 1994, Lew et al. 1994, Ando et al. 1997, Yoon et al. 2008, Eden et al. 2010, Nenonen et al. 2012, Eden et al. 2013, de Oliveira et al. 2013, Vicentini et al. 2013, Lemes et al. 2014, Zhirakovskaia et al. 2015). Após a construção da árvore filogenética foi possível observar que uma foi caracterizada como genótipo GI.2, uma como GI.5, três como GI.3, duas como GII.3, quatro como GII.4 e três como GII.6. As três amostras caracterizadas GII.3 (060F.HMI.GO, 092R.HMI.GO e 131F.HMI.GO) apresentaram 100% de identidade nucleotídica e foram designadas por um haplótipo (HP01.HMI.GO), das quatro amostras caracterizadas como GII.4, duas (123F.HMI.GO e 136F.HMI.GO) apresentaram 100% de identidade nucleotídica e foram designadas por um haplótipo (HP02.HMI.GO), e dentre as três caracterizadas GII.6, duas (174F.HMI.GO e 212F.HMI.GO) também apresentaram 100% de identidade nucleotídica e foram, portanto, designadas por um haplótipo (HP03.HMI.GO). (**Figura 6**).

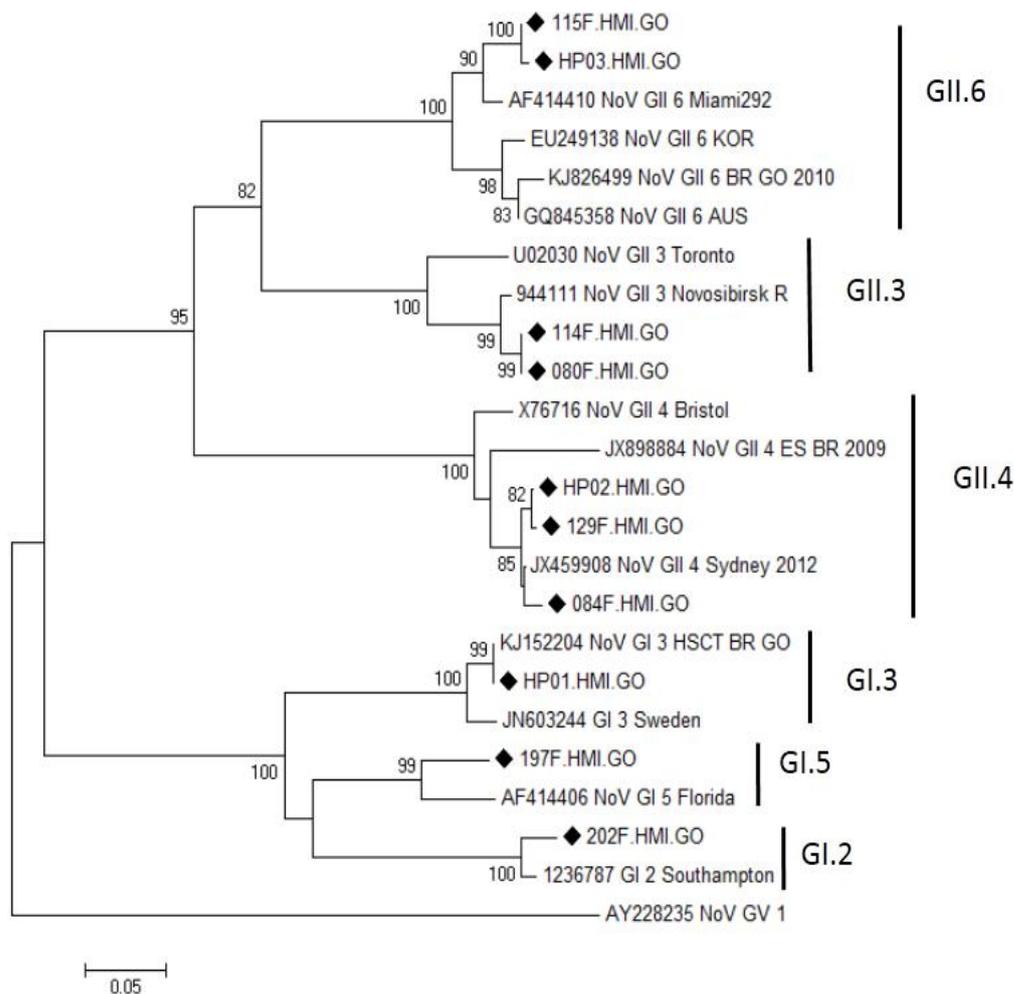


Figura 6 - Análise filogenética de uma sequência parcial (389/378 pb) do capsídeo de NoV (região C) detectados em amostras fezes e *swab* nasal de crianças com ou sem sintomas de GEA. As amostras protótipo estão representadas pelo número de acesso no GenBank. As amostras encontradas, neste estudo, estão representadas por ♦. Amostras com 100% de identidade nucleotídica foram designadas haplótipos, HP01.HMI.GO a HP03.HMI.GO. HP01.HMI.GO - representa três amostras GII.3, HP02.HMI.GO duas amostras GII.4 e duas amostras GII.6.

Dentre as 14 amostras sequenciadas, o genótipo mais encontrado foi GII.4 (28,6%, $n = 4$), seguido por GII.6 e GI.3 (21,5% cada, $n = 3$), GII.3 (14,3%, $n = 2$), GI.2 e GI.5 (7,1% cada, $n = 1$). As quatro amostras GII.4 (44,5%), três amostras GII.6 (33,3%), uma GII.3 (11,1) e uma GI.3 (11,1%) eram todas provenientes de crianças com sintomas de GEA, enquanto que duas GI.3 (40%), uma GI.2 (20%), uma GI.5 (20%) e uma GII.3 (20%) foram obtidas de crianças assintomáticas. Genótipos GII.4 e GII.6 foram encontrados somente em crianças com sintomas de GEA e GI.2 e GI.5 somente em crianças assintomáticas.

A relação entre a carga viral e genótipos está demonstrada na tabela 4. Foi observada maior carga viral em genótipos GII (média $2,50 \times 10^{10}$) quando comparado a genótipos GI (média $3,04 \times 10^8$).

Tabela 4 – Carga viral em relação aos genótipos das amostras sequenciadas

ID	Sintomas de GEA	Carga viral*	Genótipos
060F	Não	4,33 x 10 ⁷	GI.3
080F	Sim	1,71 x 10 ⁷	GII.3
084F	Sim	1,79 x 10 ⁸	GII.4
092R	Não	6,20 x 10 ⁶	GI.3
114F	Não	3,55 x 10 ⁷	GII.3
115F	Sim	8,59 x 10 ⁸	GII.6
123F	Sim	6,95x 10 ⁸	GII.4
129F	Sim	2,14 x 10 ⁹	GII.4
131F	Sim	5,58 x 10 ⁶	GI.3
136F	Sim	1,19 x 10 ⁸	GII.4
174F	Sim	1,93 x 10 ¹¹	GII.6
197F	Não	1,46 x 10 ⁹	GI.5
202F	Não	4,43 x 10 ⁶	GI.2
212F	Sim	2,79 x10 ¹⁰	GII.6

F – fezes, R – swab nasal, * CG/g, CG/mL.

A distribuição dos genótipos encontrados no estudo em relação aos meses estão demonstradas no gráfico 3, considerando todas as amostras positivas para NoV (fezes e swab). Em relação às amostras caracterizadas como GI.3, que apresentaram 100% de identidade nucleotídica e por isso foram designadas por um haplótipo (HP01.HMI.GO), essas amostras foram detectadas em meses consecutivos (agosto, setembro e outubro de 2014). Diferentemente do que ocorreu com as duas amostras GII.6 que foram também designadas por um haplótipo (HP03.HMI.GO), uma vez que a primeira amostra foi detectada em novembro e a outra somente em fevereiro. Já as amostras GII.4 que foram consideradas haplótipo (HP02.HMI.GO) foram detectadas no mesmo mês, outubro.

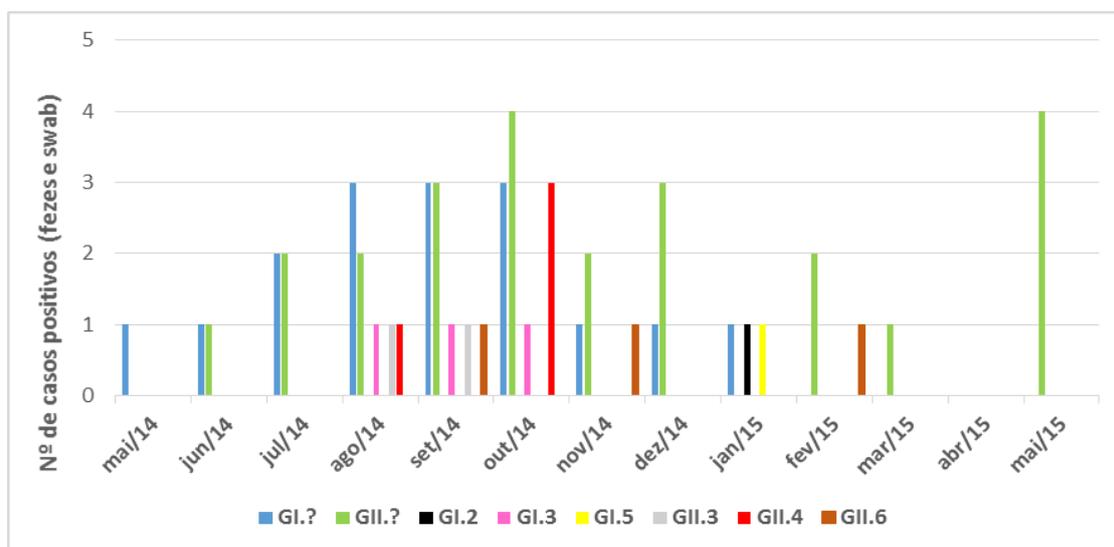


Gráfico 3 – Distribuição dos genótipos em relação aos meses, considerando os positivos para NoV (fezes e swab). GI.? E GII.? são amostras positivas que não foram genotipadas.

6. DISCUSSÃO

Os NoV são um dos principais agentes virais causadores de gastroenterite aguda mundialmente, atingindo indivíduos de todas as idades, porém os maiores índices de morbidade ocorrem entre crianças menores de cinco anos e idosos (Ahmed et al. 2014, O'Brien et al. 2016). Neste contexto, o presente estudo realizou a pesquisa de NoV, utilizando de dois métodos de detecção, em crianças com até seis anos de idade, com e sem sintomas de GEA atendidas em um hospital de referência para o atendimento infantil em Goiânia, GO durante o período de maio/2014 a maio/2015. Além disso, procedeu à determinação do *status* secretor dessas crianças para a associação com a resistência/susceptibilidade à infecção por NoV.

Neste trabalho foram realizadas duas metodologias de detecção para NoV, o RT-PCR convencional e o RT-qPCR *TaqMan* duplex. Considerando o RT-qPCR *TaqMan* duplex como “padrão ouro”, a concordância entre as metodologias utilizadas foi maior (65%) nas fezes em comparação às amostras de *swab* nasal (42%). A concordância entre as metodologias de detecção de NoV nas fezes foi mais baixa em comparação ao observado por Scipioni et al. (2008), cuja a concordância do RT-PCR convencional foi de 91%. Entretanto, nos trabalhos com amostras fecais realizados por Park et al. (2011) e Georgiadis et al. (2010) os índices de concordância considerando o RT-qPCR como “padrão ouro” foram 71,2% e 46,7%, respectivamente, sendo que o de Park et al. (2011) foi o mais próximo ao observado no presente estudo. Quanto a baixa concordância entre as metodologias para detecção de NoV em amostras de *swab* nasal poderia ser explicada pela carga viral mais baixa encontrada nessas amostras em comparação com as de fezes, deve-se ressaltar que este é o primeiro estudo a realizar esta comparação entre as metodologias em amostras de *swab*.

Como esperado, a técnica de RT-qPCR *TaqMan* duplex foi mais sensível em relação ao RT-PCR convencional (Vinjé 2014). Nossos dados reforçam que a técnica de RT-PCR em tempo real deve ser a técnica de escolha para a detecção para NoV, pois, ainda hoje, principalmente em países em desenvolvimento, são realizados estudos com o RT-PCR convencional, inclusive em casos de surtos (Raboni et al. 2014, Phumpholsup et al. 2015, Victoria et al. 2016, Wang et al. 2016). Sabe-se que a questão do alto custo constitui impedimento que ocasiona esta escolha, porém deve-se levar em consideração que os índices de detecção de NoV podem estar subestimados quando se utiliza desta técnica.

A metodologia de RT-qPCR tem sido utilizada na detecção de NoV em amostras de crianças com sintomatologia de GEA em ambiente nosocomial (Soares et al. 2007, Abugalia et al. 2011, Trang et al. 2012, Soli et al. 2014, Alam et al. 2015, Doll et al. 2016), entretanto, os autores não reportam a carga viral das amostras. Provavelmente, em razão dos ensaios terem sido feitos de forma qualitativa e não quantitativa.

Em dois estudos com delineamento semelhante foi realizada a quantificação da carga viral nas amostras de fezes, no trabalho de Huynen et al. (2013), a média da carga viral de NoV GI foi de $1,53 \times 10^6$ CG/mL e de GII $1,53 \times 10^5$ CG/mL, no presente trabalho a carga viral média é mais alta do que a relatada por Huynen et al. (2013), (média de $3,61 \times 10^{10}$ CG/g para NoV GI e média de $1,03 \times 10^{10}$ CG/g para GII), porém, diferentemente do referido estudo onde a carga viral é expressa por CG/mL, neste trabalho esta é expressa em CG/g de fezes, além disso, não ficou claro se esse resultado se refere a mL de fezes ou da suspensão fecal, podendo portanto ter sido subestimada. No Brasil, Barreira et al. (2010) encontraram carga viral média de $1,0 \times 10^{8,39}$ para as crianças sintomáticas e $1,0 \times 10^{7,15}$ para crianças assintomáticas, que são menores do que o observado no presente estudo, porém nossos dados corroboram os de Barreira et al. (2010) com relação a carga viral mais elevada (um \log_{10} a mais) ter sido detectada em amostras de pacientes sintomáticos, quando comparada a carga viral média de amostras de pacientes assintomáticos.

Apenas duas crianças apresentaram positividade para NoV em ambas as amostras, sendo que uma das crianças apresentou carga viral maior no *swab* do que nas fezes ($1,77 \times 10^8$ CG/mL no *swab* nasal e $4,33 \times 10^7$ CG/g nas fezes), sendo que esta criança não apresentava sintomas de GEA, e nas amostras da outra criança, a carga viral foi maior nas fezes do que no *swab* nasal ($2,44 \times 10^9$ CG/g nas fezes e $7,91 \times 10^6$ CG/mL no *swab* nasal), sendo que esta criança apresentava sintomas GEA. Esta detecção concomitante de NoV nas duas amostras, fezes e *swab* nasal, é um dado novo e isto pode demonstrar uma possível circulação viral no organismo através do sistema linfóide associado a mucosas (MALT), onde a partir da mucosa intestinal, via GALT, as células contendo o vírus poderiam circular pelo organismo, chegando ao tecido linfóide associado às narinas e faringe (NALT) ou até mesmo pela via inversa (Lamichhane et al. 2014). Esta possibilidade, é corroborada pela recente publicação da replicação in vitro de NoV em uma linhagem de células B de humanos, e pelo crescente número de

publicações sobre excreção prolongada e viremia de NoV (Fumian et al. 2013, Lemes et al. 2014, Jones et al. 2014).

O índice de positividade nas fezes para NoV foi de 16,9% (37/219). Na literatura, os índices de detecção de NoV em crianças hospitalizadas com idade de até seis anos de idade com ou sem sintomas gastroentéricos, variam de 6,8 a 36,5% em vários países do mundo, inclusive no Brasil (Khamrin et al. 2010, Cilli et al. 2011, Fumian et al. 2013, Bucardo et al. 2014, Amaral et al. 2015, Nakamura et al. 2015). Em estudo anterior conduzido em amostras de crianças com sintomas de gastroenterite aguda, atendidas em hospitais da região Centro-Oeste foi encontrado índice de positividade de 7,6%. Entretanto, para a pesquisa de NoV foi utilizado somente o RT-PCR convencional e pares de iniciadores para uma região conservada do genoma dos HuCV (polimerase), que não permite fazera distinção entre os gêneros NoV e SaV (Andreasi et al. 2008).

Deve-se, portanto, ressaltar que os métodos de detecção utilizados nos estudos sobre HuCV (EIE, RT-PCR convencional e RT-qPCR) diferem de estudo para estudo. Este pode ser um fator determinante na variação dos índices de detecção observados. Outro fator que deve ser considerado, quando o índice de positividade é avaliado, é que a maior parte dos estudos é realizada apenas em amostras de crianças com sintomas de GEA (Oldak et al. 2012, Raboni et al. 2014, Soli et al. 2014, Amaral et al. 2015, Fletcher et al. 2015, Tan et al. 2015), sendo escassos ainda os dados referentes a positividade de NoV em população pediátrica sem sintomatologia de GEA atendidas em hospitais.

Embora não tenha sido observada diferença significativamente estatística entre a presença ou não de sintomas gastroentéricos, neste trabalho o índice de positividade para NoV em pacientes sintomáticos foi de 18,8% (18/92) que é semelhante aos índices reportados na literatura (O’Ryan et al. 2009, Barreira et al. 2010, Huynen et al. 2013, Moyo et al. 2014, Currier et al. 2015). Entretanto, o índice de detecção nos pacientes assintomáticos (15,4%) foi maior que o observado por alguns pesquisadores (O’Ryan et al. 2009, Barreira et al. 2010, Moyo et al. 2014, Currier et al. 2015), e menor do que observado por outros como Huynen et al. (2013) e por Zhang et al. (2011), em que os índices de detecção nos assintomáticos foram 24,8% e 35,8%, respectivamente. Em um destes estudos os autores ressaltam a possível introdução de variante GII.4 pandêmica na região, o que poderia explicar seus altos índices de detecção, uma vez que a população estaria susceptível.

A infecção por NoV têm sido frequentemente associada a infecção sintomática em crianças (Raboni et al. 2014, Alam et al. 2015, Nakamura et al. 2015), entretanto, a infecção assintomática também sido reportada neste grupo populacional (Bucardo et al. 2010, Cheon et al. 2010, de Oliveira et al., 2013). Neste estudo foi encontrado um índice de positividade para NoV um pouco maior entre crianças sintomáticas, corroborando os dados de Huynen et al. (2011) que encontraram também índice de positividade um pouco mais elevado em crianças que apresentaram GEA. Além disso, a maioria das crianças positivas para NoV (61%) apresentaram os três sintomas em associação (diarreia, vômito e febre), semelhante ao encontrado na literatura (Barreira et al. 2010, Zhang et al. 2011, Grant et al. 2012, Tsai et al. 2013, Munir et al. 2014).

Embora não estatisticamente significativo, foi observado um maior número de casos em amostras de crianças de até 24 meses que também tem sido reportada por diversos trabalhos realizados na população pediátrica com ou sem sintomatologia em ambiente nosocomial (Olesen et al. 2005, Borges et al. 2006, Zhang et al. 2011, Bucardo et al. 2014, O'Brien et al. 2016).

De forma semelhante, foi observado que a grande maioria das crianças participantes do estudo tinham *status* secretor positivo, 94,6% (35/37), embora este dado não tenha sido estatisticamente significativo, portanto, não é possível afirmar que houve associação entre o *status* secretor e a positividade para NoV. Apesar de ainda ser controversa (Nordgren et al. 2010), vários autores têm relatado a associação positiva entre *status* secretor positivo e a infecção por NoV (Liu et al. 2014, Trang et al. 2014, Currier et al. 2015, Lopman et al. 2015). No Brasil, apenas um estudo foi realizado visando a associação entre o *status* secretor de crianças a infecção por NoV (Vicentini et al. 2013), onde foi observado um maior número de crianças infectadas com NoV com *status* secretor positivo (13/14), embora este dado também não tenha sido estatisticamente significativo, devido ao pequeno número de casos avaliados.

Além disso, os NoV GII foram os mais detectados nos casos sintomáticos, o que corrobora com dados na literatura que ressaltam que os NoV GII são mais associados a infecção sintomática quando comparado à infecções causadas por GI (Campos et al. 2008, Abugalia et al. 2011, Trainor et al. 2013, Moyo et al. 2014).

A cidade de Goiânia é caracterizada por um clima tropical, com a presença de duas estações bem definidas: verão (estação chuvosa) que compreende os meses de outubro a abril, e inverno (estação seca), no período de maio a setembro (INMEP 2015).

Considerando a circulação de NoV durante o período de um ano foi possível observar uma distribuição homogênea dos casos entre as estações seca e chuvosa, embora picos de detecção tenham sido observados nos meses de outubro, dezembro e janeiro, meses estes que correspondem a estação chuvosa. Acredita-se que, na maior parte do mundo, os NoV circulem durante todo o ano (Ahmed et al. 2013). Na Tanzânia, um país de clima predominantemente tropical, em estudo conduzido por Moyo et al. (2014) também foi observada a circulação de NoV em praticamente todos os meses do ano, com pico em abril, mês este da estação chuvosa no referido país. Por sua vez no Vietnã (My et al. 2013), país também de clima tropical, foi observado a correlação entre a infecção por NoV e a estação chuvosa.

No Brasil, o padrão de circulação dos NoVs parece ser variado. Em cidades das regiões sul e sudeste, foi observado maior número de casos de NoV na estação seca, embora NoV tenha sido detectado circulando durante vários meses do ano (Ferreira et al. 2012, Raboni et al. 2014). Na região norte, Siqueira et al. (2013) e Sá et al. (2015) observaram circulação de NoV em praticamente todos os meses do ano, sendo admitido que a sazonalidade de NoV é parecido com um “efeito gangorra”. Finalmente, na região centro-oeste, Borges et al. (2006) e de Oliveira et al. (2013) observaram maior positividade nos meses da estação chuvosa, sendo que no estudo de Borges et al. (2006) este resultado foi estatisticamente significativo.

Após a implementação da vacina contra Rotavírus no calendário vacinal muitos estudos vêm relatando um aumento na frequência dos casos de NoV (Hemming et al. 2013, Koo et al. 2013, Doll et al. 2016). Apesar de estudos demonstrarem que uma maior positividade de NoV em crianças que receberam a vacina contra RVA (Wikswa et al. 2013, McAtee et al. 2016, no presente estudo os índices de detecção entre as crianças com tinham o registro de terem recebido pelo menos uma dose da vacina contra RVA e as que não eram vacinadas foram semelhantes, 17,5% e 17,4%, respectivamente. Estes dados são consoantes ao estudo realizado por Bucardo et al. (2014) que também observou índices semelhantes de positividade para NoV em crianças vacinadas ou não.

Como referido anteriormente, a pesquisa do RNA de NoV em outras amostras clínicas, como o sangue, têm sido realizada por alguns autores (Fumian et al. 2013, Lemes et al. 2014), além da recente detecção de NoV em amostras de *swab* nasofaríngeano (Esposito et al. 2014), levantando mais uma vez a especulação de que a transmissão de NoV poderia ocorrer também pela via respiratória (Jones & Brosseau 2015).

Neste estudo o RNA viral foi detectado em 8,7% das amostras de *swab* nasal, índice superior ao reportado por Esposito et al. (2014), 0,5% (3/562), que realizou a pesquisa somente em *swabs* de crianças com sintomas respiratórios, não tendo sido, entretanto, realizada a quantificação da carga viral nestas amostras clínicas, nem a pesquisa em amostras de crianças com sintomas gastroentéricos.

Segundo Esposito et al. (2014), além da possível transmissão pela via respiratória, uma outra hipótese para a presença de NoV, na nasofaringe, poderia ser reflexo da presença viral transitória devido ao refluxo, causado pelo vômito, para o trato respiratório superior. Entretanto, nossos achados não corroboram esta teoria, pois não foram todas as crianças com *swab* positivo que tiveram também as fezes positivas para NoV, pois apenas duas crianças foram positivas na amostra de *swab* e fezes simultaneamente. Além disso, em somente um dos casos com *swab* e fezes positivos essa teoria seria aplicável, pois em um desses dois casos a criança não apresentou nenhum sintoma gastroentérico, enquanto que a outra criança apresentou sintomas gastroentéricos (febre, diarreia e vômito). E, ainda, dentre as crianças positivas para NoV nas fezes, 66,7% apresentam vômito e mesmo assim estas não tiveram o *swab* positivo.

Neste estudo houve a detecção de NoV genogrupo I e II, diferentemente do encontrado no trabalho de Esposito et al. (2014) que detectaram somente NoV GII em amostras de *swab* nasal. Adicionalmente, corroborando com o referido estudo uma maior positividade no *swab* nasal foi observada em crianças com até 24 meses de idade.

Por meio do sequenciamento genômico das amostras observou-se elevada variabilidade o que é consoante ao encontrado na literatura (Ferreira et al. 2012, de Oliveira et al. 2013, My et al. 2013, Vicentini et al. 2013, Moyo et al. 2014, Munjita 2015, Nakamura et al. 2015). Este é o primeiro estudo a reportar a ocorrência do genótipo GI.5 no Brasil, este genótipo tem sido encontrado em outros países do mundo como: China (Zeng et al. 2012), Paquistão (Alam et al. 2016), África do Sul (Mans et al. 2016), Uruguai (Victoria et al. 2016), dentre outros.

Foi observada maior frequência do genótipo GII.4 que é o mais encontrado associado a casos de gastroenterite aguda em diversos países (Zhang et al. 2011, My et al. 2013, Vicentini et al. 2013, Moyo et al. 2014, Raboni et al. 2014, Saito et al. 2014, Currier et al. 2015, Munjita 2015). Em segundo lugar o genótipo GII.6 foi o mais associado a casos sintomáticos, corroborando os dados encontrados por Currier et al.

(2015) e diferente do encontrado por Vicentini et al. (2013), onde GII.6 foi somente encontrado em casos assintomáticos de GEA.

No Brasil, outros estudos têm observado a predominância de GII.4 seguido por GII.6 em casos sintomáticos (Ferreira et al. 2010, 2011, Aragão et al. 2013), deve-se ressaltar que estes trabalhos foram realizados apenas com pacientes sintomáticos. Em ensaio conduzido por Sá et al. (2015) em Fortaleza, Ceará, o genótipo mais frequente foi GII.4, seguido por GII.12, e em terceiro lugar GII.6.

No Centro-Oeste, em estudo realizado por de Oliveira et al. (2013) na cidade de Goiânia com crianças de creche também foi observada elevada variabilidade de genótipos de NoV, entretanto, diferentemente do encontrado no presente estudo, o genótipo mais frequente foi GII.6 seguido por GII.4, os próprios autores relatam a oscilação temporal dos genótipos de NoV, esta flutuação poderia ser explicada pelo aumento da imunidade de rebanho para pelo menos algumas variantes de GII.

Em relação aos genótipos encontrados nas crianças assintomáticas, nenhum GII.4 foi encontrado, semelhante ao observado por Garcia et al. (2006), porém diferente do observado por Monica et al. (2007), Bucardo et al. (2010) e Cheon et al. (2010), que detectaram GII.4 em crianças assintomáticas.

Em estudos que realizaram o ensaio de RT-qPCR para detecção de NoV em casos esporádicos de GEA e que sequenciaram as amostras positivas, em geral, não estabeleceram a associação entre carga viral e genótipo. Neste estudo, foi observado que a carga viral de genótipos GI (média de $3,04 \times 10^8$) foi mais baixa quando comparado a genótipos GII (média $2,50 \times 10^{10}$). Fato este que talvez possa ser explicado pela ausência de sintomas na maioria dos casos de genótipos de GI, em comparação aos genótipos de GII, que são, a maioria, sintomáticos. Além disso, em estudo com idosos de asilos que foram acometidos por mais de um surto de NoV, Costantini et al. (2016) observaram carga viral mais elevada em paciente com genótipos GII, como o GII.4, quando comparados com pacientes infectados pelo genótipo GI.1 de NoV.

Dentre as amostras sequenciadas neste estudo, três amostras GI.3 apresentaram 100% de identidade nucleotídica sendo assim designadas haplótipos. Fato interessante é que estas amostras foram identificadas em meses consecutivos, sugerindo assim uma possível permanência viral no ambiente nosocomial. Lemes et al. (2014) também observou a persistência de um mesmo genótipo (GI.3) com alta identidade nucleotídica em estudo de monitoramento de pacientes submetidos a transplante de células hematopoéticas. Em monitoramento realizado por Morter et al. (2011) em

ambiente hospitalar, no qual eram relatados repetidos surtos por NoV, mesmo após a desinfecção do ambiente, sendo assim observado a alta resistência dos NoV à inativação. Fato este que contribui para a manutenção destes agentes virais e disseminação dos mesmos, resultando em altos índices de infecções nosocomiais.

Porém diferentemente do que foi observado com o genótipo GI.3, que foi detectado em meses consecutivos, as duas amostras GII.6 que foram representadas por um haplótipo, não foram detectadas em meses consecutivos, pois a primeira foi detectada em novembro e a outra somente em fevereiro, demonstrando assim, a circulação deste genótipo em Goiânia durante vários meses no decorrer do estudo, uma vez que outra amostra de GII.6 foi identificada também no mês de setembro de 2014.

Em relação às amostras positivas para GII.4, a primeira amostra foi detectada no mês agosto de 2014, voltando este genótipo a ser detectado dois meses depois. As outras três amostras positivas para GII.4 foram todas detectadas no mês de outubro de 2014, uma na primeira semana (123F) e as outras duas na segunda semana (129F e 136F). Segundo Morter et al. (2011), surtos são definidos como a positividade para NoV de pelo menos dois pacientes, para o mesmo genótipo viral, em uma mesma semana. Diante disso, as amostras de GII.4 detectadas na segunda semana de outubro poderiam caracterizar um pequeno surto ocorrido no ambiente hospitalar ou até mesmo na comunidade, visto que não se sabe se amostras das crianças foram coletadas no dia em que foram atendidas ou se estas ficaram internadas e tiveram as amostras coletadas posterior a sua data de admissão no hospital. Entretanto, deve-se ressaltar que as amostras detectadas na mesma semana de outubro tiveram 99% de identidade nucleotídica e as amostras designadas haplótipos neste estudo são as amostras: 123F, que foi detectada na primeira semana, e a 136F, detectada na segunda semana. Dessa forma, de modo expeculativo, a criança 123 poderia ter sido a fonte de disseminação do vírus no ambiente nosocomial.

Algumas limitações foram observadas no decorrer do estudo, como por exemplo a dificuldade no acesso dos prontuários das crianças, o que prejudicou a coleta de dados como duração dos sintomas e dias de internação. Outra limitação foi o tamanho do número amostral, eu pode ter comprometido parcialmente as análises estatísticas.

Como perspectivas, pretende-se continuar a pesquisa de NoV em amostras de *swab* nasal para uma melhor elucidadação do papel desse agente neste ambiente

extraintestinal, dados estes que podem contribuir também com o melhor entendimento da patogênese viral.

Os dados obtidos corroboram com o de estudo anterior em crianças de Goiânia demonstrando elevada frequência e variabilidade genética de NoVs, reportando ainda, pela primeira vez, a ocorrência de GI.5 NoV no Brasil. Tais dados são importantes para o conhecimento da epidemiologia dos NoVs em ambiente nosocomial, dados estes que poderão se somar às informações importantes para o desenvolvimento, em um futuro próximo, de uma vacina eficaz. Além disso, o trabalho traz um dado novo quanto a detecção de NoV em amostras de *swab* nasal, uma vez que este é o primeiro estudo a determinar a carga viral nas amostras de *swab* nasal, podendo este dado contribuir para a elucidação de uma possível rota alternativa de transmissão dos NoV.

7. CONCLUSÃO

- ❖ Foi observado considerável índice global de positividade (17%) para NoV nas fezes e em amostras de *swab* nasal (8,7%) de crianças com até seis anos de idade com ou sem sintomas de GEA atendidas em hospital de Goiânia, GO;
- ❖ Foi detectada elevada variabilidade genética dos NoV circulantes (GI.2, GI.3, GI.5, GII.3, GII.4 e GII.6) com predominância do genogrupo GII (70%) em crianças com ou sem sintomas de GEA, sendo ainda este o primeiro relato do genótipo GI.5 no Brasil;
- ❖ Foi detectada carga viral média de $1,33 \times 10^{10}$ CG/g nas fezes e de $1,32 \times 10^8$ CG/mL em amostras de *swab* nasal, sendo que as crianças com sintomas de GEA tiveram carga viral mais elevada (um \log_{10} a mais) quando comparadas a crianças sem sintomas, tanto em amostras de fezes quanto de *swab* nasal;
- ❖ A grande maioria das crianças positivas para NoV nas fezes (95%) foi caracterizada como sendo *status* secretor positivo;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abugalia M, Cuevas L, Kirby A, Dove W, Nakagomi O, Nakagomi T, Kara M, Gweder R, Smeo M, Cunliffe N. Clinical features and molecular epidemiology of rotavirus and norovirus infections in Libyan children. *J Med Virol* 83(10): 1849-1856, 2011.

Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, Koopmans M, Lopman BA. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet* 14: 725-730, 2014.

Ahmed SM, Lopman BA, Levy K. A systematic review and meta-analysis of the global seasonality of norovirus. *Plos One* 8(10): 1-7, 2013.

Alam A, Qureshi SA, Vinjé J, Zaidi A. Genetic characterization of norovirus strains in hospitalized children from Pakistan. *J Med Virol* 88(2): 216-223, 2015.

Albers MK. An unwanted visitor. Aggressive infection control strategies are needed to shorten the hospital visit of the easily spread norovirus. *Can Nurse* 100(9): 21-26, 2004.

Amaral MS, Estevam GK, Penatti M et al. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. *MemIns Oswaldo Cruz* 110(2):215-221, 2015.

Ambert-Balay K¹, Pothier P. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples *J Clin Virol* 56(3):194-198, 2013.

Ando T, Monroe SS, Noel JS, Glass RI. A one-tube method of reverse transcription-PCR to efficiently amplify a 3-kilobase region from the RNA polymerase gene to the poly (A) tail of small round-structured viruses (Norwalk-like viruses). *J Clin Microbiol* 35(3): 570-577, 1997.

Andreasi MSA, Cardoso DDP, Fernandes SM, Tozetti IA, Borges AMT, Fiaccadori FS, Santos RAT, Souza M. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 741-744, 2008.

Aragão GC, Mascarenhas JDP, Kaiano JHL, Lucena MSS, Siqueira JAM, Fumian TM, Hernandez JM, Oliveira CS, Oliveira DS, Araujo EC, Soares LS, Linhares AC, Gabbay YB. Norovirus diversity in diarrheic children from african-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. *PLos One* 8: 1-7, 2013.

Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, Al-Ibrahim MS, Chen WH, Ferreira J, Estes MK, Graham DY, Opekun AR, Richardson C, Mendelman PM. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness. *N Engl J Med* 365: 2178-21787, 2011a.

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 14: 15-37, 2001.

Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, Graham DY. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 14: 1553-1557, 2008.

Atmar RL, Neill FH, Le Guyader FS. Detection of human caliciviruses in fecal samples by rt-PCR *Methods Mol Biol* 665:39-50, 2011b.

Barclay L, Park GW, Vega E, Hall A, Parashar U, Vinje J, Lopman B. Infection control for norovirus. *Clin Microbiol Infect* 20:731-740, 2014.

Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect* 58:42-49, 2004.

Barreira DMPG, Ferreira MSR, Fumian TM, Checon R, Sadovsky ADI, Leite JPG, Miagostovich MP, Spano LC. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J Clin Virol* 47: 60-64, 2010.

Bartsch SM, Lopman BA, Hall AJ, Parashar UD, Lee By. The potential economic value of a human norovirus vaccine for the United States. *Vaccine* 30(49): 7097-7104, 2012.

Belliot G, Kamel AH, Estienney M, Ambert-Balay K, Pothier P. Evidence of Emergence of New GGII.4 Norovirus Variants from Gastroenteritis Outbreak Survey in France during the 2007-to-2008 and 2008-to-2009 Winter Seasons. *J Clin Microbiol* 48(3): 994-998, 2010.

Belliot G, Lopman BA, Ambert-Balay K, Pothier P. The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare- related infection. *Clin Microbiol Infect* 20(8): 724-730, 2014.

Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, Hammer C, Garfield M, Green KY. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells *J Virol* 77(20):10957-10974, 2003.

Bernard H, Hohne M, Niendorf S, Altmann D, Stark K. Epidemiology of norovirus gastroenteritis in Germany 2001-2009: eight seasons of routine surveillance. *Epidemiol Infect* 142 (1): 63-74, 2014.

Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* 77:11603-11615, 2003.

Bicer S, Col D, Erdag GC, Giray T, Gurol Y, Yilmaz G, Vitrinel A, Ozelgun B. A retrospective analysis of acute gastroenteritis agents in children admitted to a university hospital pediatric emergency unit. *Jundishapur J Microbiol* 7(4): 1-7, 2014.

Bok K, Abente EJ, Realpe-Quintero M, Mitra T, Sosnovtsev SV, Kapikian AZ, Green K. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J Virol* 83(22): 11890-11901, 2009.

Bok K, Parra GI, Mitra T, Abente E, Shaver CK, Boon D, Engle R, Yu C, Kapikian AZ, Sosnovtsev SV, Purcell RH, Green KY. Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 325-330, 2011.

- Bolton SL, Kotwal G, Harrison MA, Law SE, Harrison JA, Cannon JL. Sanitizer efficacy against murine norovirus, a surrogate for human norovirus, on stainless steel surfaces when using three application methods. *Appl Environ Microbiol* 79:1368–1377, 2013.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van DPME, Van der Noorda Aj. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503, 1990.
- Borges, AM, Teixeira J.M, Costa PS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco C, Brito WM, Leite JP, Cardoso DD. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 721-724, 2006.
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, 2011. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html Acessado em: agosto de 2015.
- Bucardo F, Kindberg E, Paniagua M, Grahn A, Larson G, Videvall M, Svensson L. Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua. *J Med Virol* 81(4): 728-735, 2009.
- Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, Kindberg E, Paniagua M, Mollby R, Svensson L. Asymptomatic norovirus infections in Nicaraguan children and its association with viral properties and histo-blood group antigens. *Pediatr Infect Dis J* 29: 934-939, 2010.
- Bucardo F, Reyes Y, Svensson L, Nordgren J. Predominance of norovirus and sapovirus in Nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination. *PLoS One* 9(5): 1-8, 2014.
- Bull RA, White PA. Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends Microbiol* 19(5): 233-240, 2011.
- Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, Hadley LA, Glass RI, Ando T. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples *J Clin Microbiol* 42(6):2587-95, 2004.
- Campos GS, Moreau VH, Bandeira A, Barberino G, Almeida PF, Amador DM, de Lima MO, Sardi SI. Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospital Young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. *Arch Virol* 153:1125-1129, 2008.
- Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA, Vinjé J. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J Food Prot* 69(11): 2761-2765, 2006.
- Cao S, Lou Z, Tan M, Chen Y, Liu Y, Zhang Z, Zhang XC, Jiang X, Li X, Rao Z. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 81(11): 5949-5057, 2007.

Cardoso DDP, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Martins RMB, Leite JPG. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiânia, Goiás, Brazil. *Med Sci Monit* 8:624-628, 2002.

Castriciano S, Luinstra K, Petrich A, Smieja M, Lee C, Jang D, Portillo E, Chernesky M. Comparison of the RIDASCREEN norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy *J Virol Methods* 141(2):216-219, 2007.

Caul EO. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet* 343:1240–1242, 1994.

Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus outbreak in an elementary school—District of Columbia, February 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 56:1340–1343, 2008.

Chadwick PR, McCann R. Transmission of a small round structured virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Hosp Infect* 26: 251-259, 1994.

Chan MC, Sung JJ, Lam RK, Chan PK, Lee NL, Lai RW, Leung WK. Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 12:1278–1280, 2006.

Chan MCW, Ho WS, Sung JJY. In vitro whole-virus binding of a norovirus genogroup II genotype 4 strain to cells of the lamina propria and brunner's glands in the human duodenum. *J Virol* 85(16): 8427-8430, 2011.

Chang KO & George DW. Interferons and ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replicon-bearing cells. *J Virol* 81(22): 12111-12118, 2007.

Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, King AD, Green KY. Stable expression of Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. *Virology* 353: 463-473, 2006.

Cheetham S, Souza M, Meulia T, Grimes S, Han MG, Saif LJ. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol* 80(21): 10372-10381, 2006.

Chen R, Neil JD, Noel JS, Hutson AM, Glass RI, Estes MK, Prasad BV. Inter and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J Virol* 78(12): 6469-6479, 2004.

Cheng FW, Leung TF, Lai RW, Chan PK, Hon EK, Nq PC. Rapid control of norovirus gastroenteritis outbreak in an acute paediatric ward. *Acta Paediatr* 95(5): 581-586, 2006.

Cheon DS, Jeong HS, Jeong A, Lee KB, Lee MH, Tahk H, Choi C. Seasonal prevalence of asymptomatic norovirus infection in Korean children. *Foodborne Pathog Dis* 7(11): 1427-1430, 2010.

Chhabra P, Dhongade RK, Kalrao VR, Bavdekar AR, Chitambar SD. Epidemiological, Clinical, and Molecular Features of Norovirus Infections in Western India. *J Med Virol* 81: 922- 932, 2009.

Cilli A, Luchs A, Morillo SG, Costa FF, Carmona RC, Timenetsky MCST. Characterization of rotavirus and norovirus strains: a 6- year study (2004-2009). *J Pediatr* 87(5):445-449, 2011.

Costantini VP, Cooper EM, Hardaker HL, Lee LE, Biehoff M, Biggs C, Cieslak PR, Hall AJ, Vinjé J. Epidemiologic, virologic, and host genetic factors of norovirus outbreaks in long-term care facilities. *IDSA* 62(1): 1-10, 2016.

Currier RL, Payne DC, Staat MA, Selvarangan R, S. Shirley SH, Halasa N, Boom JA, Englund JA, Szilagyi PG, Harrison CJ, Klein EJ, Weinberg GA, Wikswo ME, Parashar UD, Vinjé J, Morrow AL. Innate Susceptibility to Norovirus Infections Influenced by FUT2 Genotype in a United States Pediatric Population. *CID* 60(11): 1631-1638, 2015.

de Bruin E, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP. Diagnosis of Norovirus outbreak by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods* 137(2): 259-264, 2006.

Debbink K, Lindesmith LC, Baric RB. The State of Norovirus Vaccines. *CID* 58(12): 1746-1752, 2014.

Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF, Baric RS. Norovirus Immunity and the Great Escape. *PLoS One* 8: 1-5, 2012.

Dimitriadis A, Bruggink LD, Marshall JA. Evaluation of the Dako IDEIA norovirus EIA assay for detection of norovirus using faecal specimens from Australian gastroenteritis outbreaks *Pathology* 38(2):157-165, 2006.

Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Recomm Rep* 60: 1-18, 2011.

Dolin R, Blacklow NR, Dupont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA, Hornick R, Chanock RM. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 140: 578-583, 1972.

Dolin R, Reichman RC, Roessner KD, Tralka TS, Schooley RT, Gary W, Morens D. Detection by immune electronmicroscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 146:184-189, 1982.

Doll MK, Gagneur A, Tapiéro B, Charest H, Gonzales M, Buckeridge DL, Quach C. *Pediatr Infect Dis J* doi: 10.1097/INF.1077, 2016.

Dominguez A, Torner N, Ruiz L, Martínez A, Barrabeig I et al. Aetiology and epidemiology of viral gastroenteritis outbreaks in Catalonia (Spain) in 2004-2005. *J Clin Virol* 43: 126-131, 2008.

Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric R. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nature Rev Microb* 8: 231-241, 2010.

Doshi M, Woodwell S, Kellerher K, Mangan K, Axelrod P. An outbreak of norovirus infection in a bone marrow transplant unit. *Am J Inf Con* 41: 820-823, 2013.

- Dove W, Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneux ME, Nakagomi O, Hart CA. Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi *J Med Virol* 77(4): 522-527, 2005.
- Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of Caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 70: 4538-4543, 2004.
- Duizer E, Pielaat A, Vennema H, Kroneman A, Koopmans M. Probabilities in norovirus outbreak diagnosis *J Clin Virol* 40(1):38-42, 2007.
- Eden JS, Bull RA, Tu E, McIver CJ, Lyon MJ, Marshall JA, Smith DW, Musto J, Rawlinson WD, White PA. Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008. *J Clin Virol* 49(4): 265-271, 2010.
- Eden JS, Tanaka MM, Boni MF, Rawlinson WD, White PA. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J Virol* 87(11): 6270-6282, 2013.
- Esposito S, Daleno C, Scala A, Senatori L, Ascolese B, Principi N. Detection of norovirus in respiratory secretions in children with respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 33(3): 314-316, 2014.
- Estes MK, Prasad BV, Atmar RL. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr Opin Infect Dis* 19(5): 467-474, 2006.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8:175-185, 1998.
- Fernández JMR & Gómez JB. Infecciones por norovirus. *Emferm Infec Microbiol Clin*, 28(1):51-55, 2010.
- Ferreira MS, Xavier MP, Fumian TM, Victoria M, Oliveira SA, Pena LH, Leite JP, Miagostovich MP. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. *J Med Virol* 80: 338-344, 2008.
- Ferreira MSR, Xavier MP, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM, Assis RM, Costa FA, Oliveira SA, Leite JP, Miagostovich MP. Assessment of Gastroenteric Viruses Frequency in a Children's Day Care Center in Rio De Janeiro, Brazil: A Fifteen Year Study (1994–2008). *PLoS One* 7: 1-7, 2012.
- Fletcher S, Sibbritt D, Stark D, Harkness J, Rawlinson W, Andresen D, Van Hal S, Merif J, Ellis J. Descriptive epidemiology of infectious gastrointestinal illnesses in Sydney, Australia, 2007-2010. *WPSAR* 6(4): 7-16, 2015.
- Fonager J, Hindbaek LS, Fischer TK. Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012. *Euro Surveill.* 18(9): 204-213, 2013.
- Frenck R, Bernstein DI, Xia M, Huang P, Zhong W, Parker S, Dickey M, McNeal M, Jiang X. Predicting susceptibility to norovirus GII.4 use of a challenge model involving humans. *J Infect Dis* 206(9): 1386-1393, 2012.

Friesema IH, Vennema H, Heijne JC, de Jaeger CM, Teunis PF, van der Linde R, Duizer E, van Duynhoven YT. Differences in clinical presentation between norovirus genotypes in nursing homes. *J Clin Virol* 46(4): 341–344, 2009.

Fumian TM, Justino MC, D'Arc JPM, Reymão TK, Abreu E, Soares L, Linhares AC, Gabbay YB. Quantitative and molecular analysis of noroviruses RNA in blood from children hospitalized for acute gastroenteritis in Belém, Brazil. *J Clin Virol* 58(1): 31–35, 2013.

García C, DuPont HL, Long KZ, Santos JI, Ko G. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J Clin Microbiol* 44(8): 2997–3000, 2006.

Georgiadis S, Pilger DA, Pereira F, Cantarelli VV. Avaliação molecular de norovirus em pacientes com gastroenterite aguda. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(3): 277–280, 2010.

Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 361:1776–1785, 2009.

Glass RJ, White LJ, Ball JM, Lepare-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 74: 6581–6591, 2000.

Gómez-Santiago F, Ribas-Aparicio RM, García-Lozano H. Molecular characterization of human calicivirus associated with acute diarrheal disease in Mexican children *J Virol* 9: 1–9, 2012.

Gordon D, Desmarais C, Green P. Automated finishing with autofinish. *Genome Res* 11:614–625, 2001.

Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays *J Infect Dis* 170(1):34–43, 1994.

Grant L, Vinjé J, Parashar U, Watt J, Reid R, Weatherholtz R, Santosham M, Gentsch J, O'Brien K. Epidemiologic and clinical features of other enteric viruses associated with acute gastroenteritis in American Indian infants. *J Pediatr* 161(1): 110–115, 2012.

Gray JJ, Kohli E, Ruggeri FM, Vennema H, Sánchez-Fauquier A, Schreier E, Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Giraudon H, Pothier P, Di Bartolo I, Inglese N, de Bruin E, van der Veer B, Moreno S, Montero V, de Llano MC, Höhne M, Diedrich SM. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples *Clin Vaccine Immunol* 14(10):1349–1355, 2007.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel HJ. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 181: 322–330, 2000.

Green KY. Caliciviridae: the noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Fields virology, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 949–979, 2007.

Green KY. Caliciviridae: the noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Fields virology, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 582–608, 2013.

Green MR & Sambrook J. Molecular cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York p. 26-27, 2012.

Green SM, Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Human enteric Caliciviridae: a new prevalent small round-structured virus group defined by RNA-dependent TNA polymerase and capsid diversity. *J Gen Virol* 75(Pt 8): 1883-1888, 1994.

Green KY, Lew JF, Jiang X, Kapikian AZ, Estes MK. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations *J Clin Microbiol* 31(8):2185-2191, 1993.

Greenberg HB, Wyatt RG, Kalica AR, Yolken RH, Black R, Kapikian AZ, Chanock RM. New insights in viral gastroenteritis. In: Pollard M, ed. Perspectives in virology. Vol XI. New York: Alan Liss, p. 163-187, 1981.

Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* 253: 1- 8, 2005.

Hasing ME, Lee BE, Preiksaitis JK, Tellier R, Honish L, Senthilsevan A, Pang XL. Emergence of a new norovirus GII.4 variant and changes in the historical biennial pattern of norovirus outbreak activity in Alberta, Canada, from 2008 to 2013. *J. Clin. Microbiol.* 51(7): 2204–2211, 2013.

Health Protection Agency – HPA. British Infection Association. Healthcare Infection Society. Infection Prevention Society. National Concern for Healthcare Infections. National Health Service Confederation. Guidelines for the management of norovirus outbreaks in acute and community health and social care settings. 2012 Acessado em: agosto de 2015.

Hellberg RS, Li F, Sampath R, Yasuda IJ, Carolan HE, Wolfe JM, Brown MK, Alexander RC, Williams-Hill DM, Martin WB. Rapid detection and differentiation of human noroviruses using RT-PCR coupled to electrospray ionization mass spectrometry *Food Microbiol* 44:71-80, 2014.

Hemming M, Räsänen S, Huhti L, Paloniemi M, Salminen M, Vesikari T. Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. *Eur J Pediatr* 172(6):739-746, 2013.

Hill VR, Mull B, Jothikumar N, Ferdinand K, Vinjé J. Detection of GI and GII Noroviruses in ground water using ultrafiltration and TaqMan real-time RT-PCR. *Food Environ Virol* 2:218-224, 2010.

Huang P, Farkas T, Marionneau S, Zhong W, Ruvoën-Clouet N, Morrow AL, Altaye M, Pickering LK, Newburg DS, LePendou J, Jiang X. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns *J Infect Dis* 188(1): 19-31, 2003.

Hutson AM, Atmar RL & Estes MK. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends in Microbiol* 12: 279-287, 2004.

Hutson JM; Pacific association of pediatric surgeons. 35th annual meeting of the pacific association of pediatric surgeons. *J Pediatr Surg* 37(12): 1775, 2002.

Huynen P, Mauroy A, Martin C, Savadogo LGB, Boreux R, Thiry E, Melin P, de Mol P. Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *J Clin Virol* 58: 515-521, 2013.

ICTV. Virus Taxonomy: 2014 Release. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/>. Acessado em: 10 de maio de 2015.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia – Dados históricos. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Acesso em março de 2016.

Iturriza-Gómara M & Lopman B. Norovirus in healthcare settings. *Curr Opin Infect Dis* 27(5): 437-443, 2014.

Iwakiri A, Ganmyo H, Yamamoto S, Otao K, Mikasa M, Kizoe S, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion. *Arch Virol* 154: 689-693, 2009.

Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 195: 51-61, 1993.

Jiang X, Wilton N, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, Barrett E, Guerrero M, Ruiz-Palacios G, Green KY, Green J, Hale AD, Estes MK, Pickering LK, Matson DO. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays *J Infect Dis Suppl* 2:S349-59, 2000.

Jimenez L & Chiang M. Virucidal activity of a quaternary ammonium compound disinfectant against feline calicivirus: a surrogate for norovirus. *Am J Infect Control* 34:269–273, 2006.

Jones MK, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes LR, Grau KR, Gonzalez-Hernandez MB, Iovine NM, Wobus CE, Vinjé J, Tibbetts SA, Wallet SM, Karst SM. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* 346(6210): 755-759, 2014.

Jones RM, Brosseau LM. Aerosol transmission of infection disease. *J Occup Environ Med* 57(5): 501-508, 2015.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR *J Clin Microbiol* 41(4):1548-57, 2003.

Kankanamalage ACG, Kim Y, Weerawama PM, Uy AZ, Damalanka VC, Mandapuru SR, Alliston KR et al. Structure-guided design and optimization of dipeptidyl inhibitors of norovirus 3CL protease. Structure-activity relationships and biochemical, X-ray Crystallographic, Cell-Based, and In vivo studies. *J Med Chem* 58: 3144-3155, 2015.

- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10: 1075-1081, 1972.
- Kapikian AZ. The Discovery of the 27-nm Norwalk Virus: An Historic Perspective. *JID* 181 (2): 295-302, 2000.
- Karst SM, Wobus CE, Goodfellow IG, Green KY, Virgin HW. Advances in Norovirus *Biology Cell Host Microbe* 15(6): 668-680, 2014.
- Kele B, Lengyel G, Deak J. Comparison of an ELISA and two reverse transcription polymerase chain reaction methods for norovirus detection *Diagn Microbiol Infect Dis* 70(4): 475-478, 2011.
- Khamrin P, Mannekam N, Thongprachum A, Chaimongkol N, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of New Norovirus Variants and Genetic Heterogeneity of Noroviruses and Sapoviruses in Children Admitted to Hospital With Diarrhea in Thailand. *J Med Virol* 82: 289-296, 2010.
- Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, Boxrud D, Sloan LM, Cunningham SA, Pritt BS, Binnicker MJ. Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. *J Clin Microbiol* 52(10): 3667-3673, 2014.
- Kim Y, Thapa M, Hua DH, Chang KO. Biodegradable nanogels for oral delivery of interferon for norovirus infection. *Antiviral Res* 89:165-173, 2011.
- Kingsley DH, Vincent EM, Meade GK, Watson CL, Fan X. Inactivation of human norovirus using chemical sanitizers. *Int J Food Microbiol* 171: 94-99, 2014.
- Kirby AE, Shi J, Montes M, Lichtenstein M, Moe CL. Disease Course and viral shedding in experimental Norwalk virus and Snow Mountain Virus Infection. *J Med Virol* 86:2055-2064, 2014.
- Kirkwood CD, Clark R, Bogdanovic-Sakran N, Bishop RF. 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) *J Med Virol* 77(1):96-101, 2005.
- Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses *J Virol Methods* 100(1-2):107-114, 2002.
- Koo HL, Neill FH, Estes MK, Munoz FM, Cameron A, DuPont HL, Atmar RL. Noroviruses: The most common pediatric viral enteric pathogen at a Large University Hospital after introduction of rotavirus vaccination. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2(1): 57-60, 2013.
- Koopmans M & Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* 90: 23-41, 2004.

Koopmans M. Noroviruses in healthcare settings: a challenging problem. *J Hosp Infect* 73(4): 331–337, 2009.

Koopmans M. Progress in understanding norovirus epidemiology. *Curr Opin Infect Dis* 21: 544-552, 2008.

Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382:209–222, 2013.

Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort HV, Peñaranda S, Oberste MS, Vinjé J, Koopmans. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol* 51(2): 121-125, 2011.

Kumar S, Stecher G, and Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* (submitted).

Lai CC, Wang YH, Wu CY, Hung CH, Jiang DD, Wu FT. A norovirus outbreak in a nursing home: norovirus shedding time associated with age. *J Clin Virol* 56(2): 96–101, 2013.

Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Sequence and genome organization of human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 259(5094): 516-519, 1993.

Lambert SB, Whiley DM, O’Neil NT, Andrews EC, Canavan FM, Bletchly C, Siebert DJ, Sloots TP, Nissen MD. Comparing nose-throat swabs and nasopharyngeal aspirates collected from children with symptoms for respiratory virus identification using real-time polymerase chain reaction. *Pediatrics* 122(3): 615-620, 2008.

Lay MK, Atmar RL, Guix S, Bharadway U, He H, Neill FH, Sastry KJ, Yao Q, Estes MK. Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans. *Virology* 406(1): 1 -11, 2010.

Le Pendu J, Ruvoën-Clouet N, Kindberg E, Svensson L. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin Immunol* 18(6): 375-386, 2006.

Lemes LG, Corrêa TS, Fiaccadori FS, Cardoso Dd, Arantes Ade M, Souza KM, Souza M. Prospective study on Norovirus infections among allogeneic stem cell transplant recipients: prolonged viral excretion and RNA viral in blood. *J Clin Virol* 61(3): 329-333, 2014.

Lew JF, Petric M, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, Green KY. Identification of minireovirus as a Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. *J Virol* 68(5): 3391-3396, 1994.

Li J, Predmore A, Divers E, Lou F. New Interventions against human norovirus: progress, opportunities, and challenges. *Annu Rev Food Sci Technol* 3: 331-352, 2012.

Lindell AT, Grillner L, Svensson L, Wirgart BZ. Molecular epidemiology of norovirus infections in Stockholm, Sweden, during the years 2000 to 2003:

association of the GGIIb genetic cluster with infection in children *J Clin Microbiol* 43(3):1086-1092, 2005.

Lindesmith L, Moe C, LePendu, J, Frelinger JA, Treanor J, Baric RS. Cellular and Humoral Immunity following Snow Mountain Virus Challenge. *J Virol* 79(5): 2900-2909, 2005.

Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, Lependu J, Baric R. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med* 9: 548-553, 2003.

Lindesmith LC, Debbink K, Swanstrom J, Vinjé J, Costantini V, Baric RS, Donaldson EF. Monoclonal antibody-based antigenic mapping of norovirus GII.4-2002 *J Virol* 86(2):873-383, 2012.

Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, Baric RS. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* 5(2):e31, 2008.

Liu P, Wang X, Lee JC, Teunis P, Hu S, Paradise HT, Moe C. Genetic susceptibility to norovirus GII.3 and GII.4 infections in Chinese pediatric diarrheal disease. *Pediatr Infect Dis* 33(11): e305-e309, 2014.

Liu P, Yuen Y, Hsiao HM, Jaykus LA, Moe C. Effectiveness of liquid soap and hand sanitizer against Norwalk virus on contaminated hands. *Appl Environ Microbiol* 76: 394-399, 2010.

Lopman B. Air sickness: vomiting and environmental transmission of norovirus on aircraft. *Clin Infect Dis* 53: 521-522, 2011.

Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Hill D, Perry C, Halladay T, Brown DW, Edmunds WJ, Sarangi J. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. *Emerg Infect Dis* 10:1827-1834, 2004.

Lopman BA, Trivedi T, Vicuña Y, Costantini V, Collins N, Gregoricus N, Parashar U, Sandoval C, Broncano N, Vaca M, Chico ME, Vinjé J, Cooper PJ. Norovirus infection and disease in Ecuadorian birth cohort: association of certain norovirus genotypes with host FUT2 secretor status. *J Infect Dis* 211(11):1813-1821, 2015.

Ludwig A, Adams O, Laws HJ, et al. Quantitative detection of norovirus excretion in pediatric patients with cancer and prolonged gastroenteritis and shedding of norovirus. *J Med Virol* 80(8): 1461-1467, 2008.

MacCannell T, Umscheid CA, Agarwal RK, Lee I, Kuntz G, Stevenson KB, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for the prevention and control of norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings. *Infect Control Hosp Epidemiol* 32:939-969, 2011.

Macinga DR, Sattar SA, Jaykus LA, Arbogast JW. Improved inactivation of nonenveloped enteric viruses and their surrogates by a novel alcohol-based hand sanitizer. *Appl Environ Microbiol* 74(16): 5047-5052, 2008.

- Mai H, Jin M, Guo X, Liu J, Liu N, Cong X, Gao Y, Wei L. Clinical and epidemiologic characteristics of norovirus GII.4 Sydney during winter 2012–13 in Beijing, China following its global emergence. *PLoS One* 8(8): 1-7, 2013.
- Malasao R, Maneekarn N, Khamrin P, Pantip C, Tonusin S, Ushijima H, Peerakome S. Genetic diversity of norovirus, sapovirus, and astrovirus isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand *J Med Virol* 80(10): 1749-1755, 2008.
- Mans J, Murray TY, Nadan S, Netshikweta R, Page NA, Taylor MB. Norovirus diversity in children with gastroenteritis in South Africa from 2009 to 2013: GII.4 variants and recombinant strains predominate. *Epidemiol Infect* 144(5): 907-916, 2016.
- Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac- Vaidye B, Clément M, Cailleau-Thomas, A, Ruitz- Palacois G, Huang P, Jiang X, Le Pendu J. Norwalk virus binds to histo- blood groups antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterol* 122: 1967-1977, 2002.
- Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, Wedgwood K, Fey RE, Caul E. O. A school outbreak of Norwalk-like virus: Evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect* 131: 727-736, 2003.
- Mast TC, Wang FT, Su S, Seeger JD. Evidence of Herd Immunity and Sustained Impact of Rotavirus Vaccination on the Reduction of Rotavirus-Related Medical Encounters Among Infants from 2006 through 2011 in the United States. *Pediatr Infect Dis J* 34: 615-620, 2015.
- Matsui SM & Greenberg HB. Immunity to calicivirus infection. *J Infect Dis* 181: 331-335, 2000.
- Matthews RE. Classification and nomenclature of viruses. *Interviol* 12: 129-296, 1979
- Matthews JE, Dickey BW, Miller RD, Felzer JR, Dawson BP, Lee AS, Rocks JJ, Kiel J, Montes JS, Moe CL, Eisenberg JN, Leon JS. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiol Infect* 140(7): 1161-72, 2012.
- Maunula L, Von Bonsdorff CH. Norovirus genotypes causing gastroenteritis outbreaks in Finland 1998–2002. *J Clin Virol* 34(3): 186–194, 2005.
- McAtee CL, Webman R, Gilman RH, Mejia C, Bern C, Apaza S, Espetia S, Pajuelo M, Saito M, Challappa R, Soria R, Ribera JP, Lozano D, Torrico F. Burden of norovirus and rotavirus in children after rotavirus vaccine introduction, Cochabamba, Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 6;94(1):212-217, 2016.
- Medici MC, Abelli LA, Dodi I, Dettori G, Chezzi C. Norovirus RNA in the blood of a child with gastroenteritis and convulsions—a case report. *J Clin Virol* 48:147–149, 2010.
- Meeroff JC, Schreiber DS, Trier JS, Blacklow NR. Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. *Ann Intern Med* 92:370–373, 1980.

Miura T, Parnaudeau S, Grodzki M, Okabe S, Atmar RL, Le Guyader FS. Environmental detection of genogroup I, II, and IV noroviruses by using a generic real-time reverse transcription-PCR assay *Appl Environ Microbiol* 79(21):6585-6592, 2013.

Monica B, Ramani S, Banerjee I, Primrose B, Iturriza-Gomara M, Gallimore CI, Brown DW, M F, Moses PD, Gray JJ, Kang G. Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India *J Med Virol* 79(5): 544-551, 2007.

Monroe SS, Stine SE, Jiang X, Estes MK, Glass RI. Detection of antibody to recombinant Norwalk virus antigen in specimens from outbreaks of gastroenteritis *J Clin Microbiol* 31(11):2866-2872, 1993.

Morter S, Bennet G, Fish J, Richards J, Allen DJ, Nawaz S, Iturriza-Gómara M. Norovirus in the hospital setting: virus introduction and spread within the hospital environment. *J Hosp Infec* 77: 106-112, 2011.

Moyo S, Hanevik K, Blomberg B, Kommedal O, Vainio K, Maselle S, Langeland N. Genetic diversity of norovirus in hospitalised diarrhoeic children and asymptomatic controls in Dar es Salaam, Tanzania. *Infec, Genet Evol* 26: 340-347, 2014.

Mumphrey SM, Changotra H, Moore TN, Heimann-Nichols ER, Wobus CE, Reilly MJ, Moghadamfalahi M, Shukla D, Karst SM. Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT-1-dependent interferon responses. *J Virol* 81:3251-3263, 2007.

Munir N, Liu P, Gastañaduy P, Montes J, Shane A, Moe C. Norovirus infection in immunocompromised acute gastroenterites. *J Med Virol* 86: 1203-1209, 2014.

Munjita SM. Current status of norovirus infections in children in sub-saharan Africa. *Journal of Tropical Medicine* 2015.

Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S, Katayama K. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLoS One* 8(6):e66534, 2013.

My PV, Thompson C, Phuc HL, Tuyet PT, Vinh H, Hoang NV, Minh PV, Vinh NT, Thuy CT, Nga TT, Hau NT, Campbell J, Chinh NT, Thuong TC, Tuan HM, Farrar J, Baker S. Endemic norovirus infections in children, Ho Chi Minh City, Vietnam, 2009-2010. *Emerg Infect Dis* 19(6):977-980, 2013.

Nakamura N, Kobayashi S, Minagawa H, Matsushita T, Sugiura W, Iwatani Y. Molecular epidemiology of enteric viroses in patients with gastroenterites in Aichi Prefecture, Japan, 2008/09 – 2013/14. *J Med Virol* doi 10.1002/jmv.24445, 2015.

National Disease Surveillance Centre Ireland. National guidelines on the management of outbreaks of norovirus infection in healthcare settings. 2004. Acessado em: maio de 2015.

Navidad JF, Griswold DJ, Gradus MS, Bhattacharyya S. Evaluation of Luminex xTAG gastrointestinal pathogen analyte-specific reagents for high-throughput, simultaneous

detection of bacteria, viruses, and parasites of clinical and public health importance *J Clin Microbiol* 51(9):3018-3024, 2013.

Nenonen NP, Hannoun C, Larsson CU, Bergström T. Marked genomic diversity of norovirus genogroup I strains in a waterborne outbreak. *Appl Environ Microbiol* 78(6): 1846-1852, 2012.

New Zealand Ministry of Health. Guidelines for the management of norovirus outbreaks in hospital and elderly care institutions, 2009. Acessado em: maio de 2015.

Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, Monroe SS, Glass RI. Identification of a distinct common strain of 'Norwalk-like viruses' having a global distribution. *J. Infect. Dis.* 179(6): 1334-1344, 1999.

Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, Estes MK, Seto Y, Monroe SS, Glass RI. 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 *J Med Virol* 53(4):372-383, 1997.

Nordgren J, Kindberg E, Lindgren PE, Matussek A, Svensson L. Norovirus gastroenteritis outbreak with a secretor-independent susceptibility pattern, Sweden. *Emerg Infect Dis* 16(1): 81-97, 2010.

Nordgren J, Nitiema LW, Ouermi D, Simpore J, Svensson L. Host genetic factors affect susceptibility to norovirus infections in Burkina Faso. *PLoS One* 8(7): e69557, 2013.

O'Brien SJ, Donaldson AL, Iturriza-Gomara M, Tam CC. Age-specific incidence rates for norovirus in the community and presenting to primary healthcare facilities in the United Kingdom. *JID* 213(S1): S15-S18, 2016.

O'Neill PD, Marks RJ. Bayesian model choice and infection route modelling in an outbreak of Norovirus. *Stat Med* 24: 2011-2024, 2005

Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif L. Comprehensive review of human sapoviruses. *CMR* 28: 32-53, 2015.

Oldak E, Sulik A, Rozkiewicz D, Liwoch-Nienartowicz N. Norovirus infections in children under 5 years of age hospitalized due to the acute viral gastroenteritis in northeastern Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 417-422, 2012.

Olesen B, Neimann J, Böttiger B, Ethelberg S, Schiellerup P, Jensen C, Helms M, Scheutz F, Olsen KEP, Krogh K, Petersen E, Molbakk K, Gerner-Smidt P. Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. *J Clin Microbiol* 53: 3636-3641, 2005.

de Oliveira, MMD, Souza M, Fiaccadori FS, Santos CPH, Cardoso DDP. Monitoring of Calicivirus among day-care children: evidence of asymptomatic viral excretion and first report of GI.7 Norovirus and GI.3 Sapovirus in Brazil. *J Med Virol* 86(9): 1569-1575, 2013.

Oliver SL, Asobayire E, Dastjerdi AM, Bridger JC. Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology* 350:240–250, 2006.

O’Ryan ML, Lucero Y, Prado V, Santolaya ME, Rabello M, Solis Y, Berríos D, O’Ryan-Soriano MA, Cortés H, Mamani N. Symptomatic and asymptomatic rotavirus and norovirus infections during infancy in a Chilean birth cohort *Pediatr Infect Dis J* 28(10): 879-884, 2009.

Pang XL, Joensuu J, Vesikari T. Human calicivirus-associated sporadic gastroenteritis in Finnish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Pediatr Infect Dis J* 18:420–426, 1999.

Pang X, Lee BE. Laboratory Diagnosis of Noroviruses: Present and Future *Clin Lab Med* 35(2): 345-362, 2015.

Pang XL, Preiksaitis JK, Lee BE. Enhanced enteric virus detection in sporadic gastroenteritis using a multi-target real-time PCR panel: a one-year study *J Med Virol* 86(9): 1594-1601, 2014.

Park GW, Barclay L, Macinga D, Charbonneau D, Pettigrew CA, Vinjé J. Comparative efficacy of seven hand sanitizers against murine norovirus, feline calicivirus, and GII.4 norovirus. *J Food Prot* 73(12): 2232-2238, 2010.

Park GW, Vinjé J, Sobsey MD. The comparison of UV and chlorine disinfection profiles of murine norovirus (MNV-1), feline calicivirus (FCV), and coliphage MS2. *ASM*, Orlando, Florida, 2006.

Park Y, Cho Y-H, Ko G. A duplex real-time RT-PCR assay for the simultaneous genogroup-specific detection of noroviruses in both clinical and environmental specimens. *Virus Genes* 43:192-200, 2011.

Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow, NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 297: 86-89, 1977.

Patel MM, Hall AJ, Vinje J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol* 44:1–8, 2009.

Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis *Emerg Infect Dis* 14(8): 1224-1231, 2008.

Payne DC, Vinjé J, Szilagyi PG, Edwards KM, Staat MA, Weinberg GA, Hall CB, Chappell J, Bernstein FI, Curns AT, Wiskwo M, Shirley SH, Hall AJ, Lopman B, Parashar UD. Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. *N Engl J Med* 368(12): 1121-1130, 2013.

Phumpholsup T, Theamboonlers A, Wanlapakorn N, Felber JA, Suvaporn A, Puthanakit T, Chomto S, Payunqorn S, Poovorawan Y. Norovirus outbreak at a daycare center in Bangkok, 2014. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 46(4): 616-623, 2015.

- Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286: 287-290, 1999.
- Pringle K, Lopman B, Vega E, Vinjé J, Parashar UD, Hall A. Noroviruses: epidemiology, immunity and prospects for prevention. *Future Microbiol* 10(1): 53-67, 2015.
- Puustinen L, Blazevic V, Salmine M, Hämäläinen M, Räsänen S, Vesikari T. Noroviruses as a major cause of acute gastroenteritis in children in Finland, 2009 – 2010. *Scand J Infect Dis* 43: 804-808, 2011.
- Raboni SM, Damasio GAC, Ferreira CEO, Pereira LA, Nogueira MB, Vidal LR, Cruz CR, Almeida SM. Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalized children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109(4): 428-435, 2014.
- Ramani S, Neill F, Opekun AR, Gilger MA, Graham DY, Estes MK, Atmar RL. Mucosal and Cellular immune responses to Norwalk virus. *JID* 1-9, 2015.
- Ramani S, Atmar RL, Estes MK. Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. *Curr Opin Gastroenterol* 30(1): 25-33, 2014.
- Ren Z, Kong Y, Wang J, Wang Q, Huang A, Xu H. Etiological study of enteric viruses and the genetic diversity of norovirus, sapovirus, adenovirus, and astrovirus in children with diarrhea in Chongqing, China. *BMC Infect Dis* 13: 412, 2013.
- Rha B, Burrer S, Park S, Trivedi T, Parashar UD, Lopman BA. Emergency department visit data for rapid detection and monitoring of norovirus activity, United States *Emerg Infect Dis* 19(8): 1214-1221, 2013.
- Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. *Clin Microbiol Rev* 28(1): 134-164, 2015.
- Rocha-Pereira J, Cunha R, Pinto DC, Silva AM, Nascimento MS (E)-2-styrylchromones as potential anti-norovirus agents. *Bioorg Med Chem* 18:4195–4201, 2010.
- Rockx BH, Bogers WM, Heeney JL, van Amenorogen G, Koopmans MP. Experimental norovirus infections in non-human primates. *J Med Virol* 75:313–320, 2005.
- Rolfe KJ, Parmar S, Mururi D, Wreghitt TG, Jalal H, Zhang H, Curran MD. An internally controlled, one-step, real-time RT-PCR assay for norovirus detection and genogrouping *J Clin Virol* 39(4):318-321, 2007.
- Rossignol JF & El-Gohary YM. Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aliment Pharmacol Ther* 24: 1423-1430, 2006.
- Rydell GE, Kindberg E, Larson G, Svensson L. Susceptibility to winter vomiting disease: a sweet matter. *Rev Med Virol* 21(6):370-382, 2011.

Sá ACC, Gómez MM, Lima FN, Quetz JS, Havt A, Oirá RB, Lima AA, Leite JPG. Group A rotavirus and norovirus genotypes circulating in the northeastern Brazil in the post-monovalent vaccination era. *J Med Virol* 87: 1480-1490, 2015.

Saito M, Goel-Apaza S, Espetia S, Velasquez D, Cabrera L, Loli S, Crabtree JE, Black RE, Kosek M, Checkley W, Zimic M, Bern C, Cama V, Gilman RH. Multiple norovirus infections in birth cohort in Peruvian periurban community. *CID* 58(4): 483-491, 2014.

Sakon N, Yamazaki K, Yoda T, Tsukamoto T, Kase T, Taniguchi K, Takahashi K, Otake T. Norovirus storm in Osaka, Japan, last winter (2006/2007). *Jpn J Infect Dis* 60(6): 409-410, 2007.

Santos HCP, Turones LC, Fiaccadori FS, Cardoso DDP, Souza MBLD. Screening fecal samples from asymptomatic children, for norovirus detection, using a third generation enzyme immunoassay commercial kit. *Rev Pat Trop* 43(2): 143-149, 2014.

Scipioni A, Bourgot I, Mauroy A, Zaint D, Saegerman C, Daube G, Thiry E. Detection and quantification of human and bovine norovirus by a TaqMan RT-PCR assay with a control for inhibition. *Mol Cell Probes* 22: 215-222, 2008.

Schmid M, Oehme R, Schalasta G, Brockmann S, Kimmig P, Enders G. Fast detection of Noroviruses using a real-time PCR assay and automated sample preparation *BMC Infect Dis* 4:15, 2004.

Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. The small intestinal lesion induced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Infect Dis* 129:705-708, 1974.

Schultz AC, Vega E, Dalsgaard A, Christensen LS, Nørrung B, Hoorfar J, Vinjé J. Development and evaluation of novel one-step TaqMan realtime RT-PCR assays for the detection and direct genotyping of genogroup I and II noroviruses *J Clin Virol* 50(3): 230-234, 2011.

Schwartz S, Vergoulidou M, Schreier E, Loddenkemper C, Reinwald M, Schmidt-Hieber M, Flegel WA, Thiel E, Schenider T. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 117: 5850-5856, 2011.

Shimizu-Onda Y, Akasaka T, Yagyu F, Komine-Aizawa S, Tohya Y, Hayakawa S, Ushijima H. The virucidal effect against murine norovirus and feline calicivirus as surrogates for human norovirus by ethanol-based sanitizers. *J Infect Chemother* 19(4): 779-781, 2013.

Shirato H. Norovirus and histo-blood group antigens. *Jpn J Infect* 64: 95-103, 2011.

Sickbert-Bennett EE, Weber DJ, Gergen-Teague MF, Sobsey MD, Samsa GP, Rutala WA. Comparative efficacy of hand hygiene agents in the reduction of bacteria and viruses. *Am J Infect Control* 33: 67-77, 2005.

Siebenga JJ, Beersma MF, Vennema H, van Biezen P, Hartwig NJ, Koopmans M. High prevalence of prolonged norovirus shedding and illness among hospitalized patients: a model for in vivo molecular evolution. *J infect Dis* 198: 994-1001, 2008.

- Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B *et al.* Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol* 81(18): 9932–9941, 2007.
- Simmons K, Gambhir M, Leon J, Lopman B. Duration of Immunity to Norovirus Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 19: 1260-1267, 2013.
- Siqueira JAM, Linhares AC, Carvalho TCN, Aragão GC, Oliveira DS, Santos MC, Sousa MS, Justino MC, Mascarenhas JDP, Gabbay YB. Norovirus infection in children admitted to hospital for acute gastroenteritis in Belém, Pará, Northern Brazil. *J Med Virol* 85: 737-744, 2013.
- Siqueira JA, Linhares Ada C, Oliveira Dde S, Soares Lda S, Lucena MS, Wanzeller AL, Mascarenhas JD, Gabbay YB. Evaluation of third-generation RIDASCREEN enzyme immunoassay for the detection of norovirus antigens in stool samples of hospitalized children in Belém, Pará, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71(4):391-395, 2011.
- Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MCM, Maranhão AG, Rocha LN, Ramírez ML, Monroe SS, Glass RI, Gentsch J. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 13(8): 1244-1246, 2007.
- Soli KW, Maure T, Kas MP, Bande G, Bebes S, Luang-Suarkia D, Siba PM, Morita A, Umezaki M, Greenhill AR, Horwood PF. Detection of enteric viral and bacterial pathogens associated with paediatric diarrhoea in Goroka, Papua New Guinea. *IJID* 27:54-58, 2014.
- Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, Prikhodko VG, Thackray LB, Wobus CE, Karst SM, Virgin HW, Green KY. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* 80(16): 7816-7831, 2006.
- Sosnovtsev SV, Green KY. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology* 277: 193-203, 2000.
- Souza M, Azevedo MS, Jung K, Cheetham S, Saif LJ. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *J Virol* 82: 1777-1786, 2008.
- Straub TM, Höner zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, Valdez CO, Bruckner-Lea CJ, Gerba CP, Abbaszadegan M, Nickerson CA. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis* 13(3): 396-403, 2007.
- Svensson L, Petersson A, Henry SM. Secretor genotyping for A385T, G428A, C571T, C628T, 685delTGG, G849A, and other mutations from a single PCR. *Transfusion* 40(7): 856-860, 2000.
- Svraka S, Duizer E, Vennema H *et al.* Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J Clin Microbiol* 45(5): 1389–1394, 2007.

Tan D, Deng L, Wang M, Li X, Ma Y, Liu W. High prevalence and genetic diversity of noroviruses among children with sporadic acute gastroenteritis in Nanning City, China, 2010-2011. *J Med Virol* 87:498-503, 2015.

Tan M, Xia M, Chen Y, Bu W, Hegde RS, Meller J, Li X, Jiang X. Conservation of carbohydrate binding interfaces: evidence of human HBGA selection in norovirus evolution. *PLoS One* 4(4): e5058, 2009.

Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, Le Pendu J, Calderon RL. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol* 80: 1469-1476, 2008.

Teunis PFM, Sukhrie FHA, Vennema H, Bogerman J, Beersma MFC, Koopmans MPG. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. *Epidemiol Infect* 143: 1710-1717, 2015.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882, 1997.

Thornhill TS, Wyatt RG, Kalica AR, Dolin R, Chanock RM, Kapikian AZ. Detection by immune electron microscopy of 26- to 27 -nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* 135: 20-27, 1977.

Trainor E, Lopman B, Iturriza-Gomara M, Dove W, Ngwira B, Nakagomi O, Nakagomi T, Parashar UD, Cunliffe N. Detection and molecular characterisation of norovirus in hospitalised children in Malawi, 1997-2007. *J Med Virol* 85(7): 1299-1306, 2013.

Trang NV, Luan LT, Kim-Anh LT, Hau VTB, Nhung LTH, Phasuk P, Setrabutr O, Shirley H, Vinjé J, Anh DD, Mason CJ. Detection and molecular characterization of noroviruses and sapoviruses in children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Vietnam. *J Med Virol* 84: 290-297, 2012.

Treanor JJ, Jiang X, Madore HP, Estes MK. Subclass-specific serum antibody responses to recombinant Norwalk virus capsid antigen (rNV) in adults infected with Norwalk, Snow Mountain, or Hawaii virus *J Clin Microbiol* 31(6):1630-1634, 1993.

Tsai CN, Lin CY, Lin CW, Shih KC, Chiu CH, Chen SY. Clinical relevance and genotypes of circulating noroviruses in northern Taiwan, 2006-2011. *J Med Virol* 86(2): 335-346, 2014.

Tse H, Lau SK, Chan WM, Choi GK, Woo PC, Yuen KY. Complete genome sequences of novel canine noroviruses in Hong Kong. *J Virol* 86 (17): 9531-9532, 2012.

Van Trang N, Vu HT, Le NT, Huang P, Jiang X, Anh DD. Association between norovirus and rotavirus infection and histo-blood group antigens types in Vietnamese children. *J Clin Microbiol* 52(5): 1366-1374, 2014.

Vashist S, Urena L, Gonzalez-Hernandez MB, Choi J, Rougemont A, Rocha-Pereira J, Neyts J, Hwang S, Wobus CE, Goodfellow I. The molecular chaperone Hsp90 is a therapeutic target for noroviruses. *J Virol* 89(12): 6352-6363, 2015.

Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States. *J Clin Microbiol* 52(1): 147-155, 2014.

Vega E, Vinjé J. Novel GII.12 norovirus strain United States, 2009-2010 *Emerg Infect Dis* 17(8):1516-1518, 2011.

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* 25(2):233-235, 2002.

Vicentini F, Denadai W, Gomes YM, Rose TL, Ferreira MS, Le Moullac-Vaidye B, Le Pendu J, Leite JP, Miagostovich MP, Spano LC. Molecular characterization of norovirus and HBGA from infected Quilombola children in Espirito Santo State, Brazil. *PLoS One* 8(7):1-9, 2013.

Victoria M, Tort LF, Lizasoain A, García M, Castells M, Berois M, Divizia M, Leite JP, Miagostovich MP, Cristina J, Colina R. Norovirus molecular detection in Uruguayan sewage samples reveals a high genetic diversity and GII.4 variant replacement along time. *J Appl Microbiol* doi: 10.1111/jam.13058, 2016.

Vinjé J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods* 116: 109-117, 2004.

Vinjé J, Vennema H, Maunula L, von Bonsdorff CH, Hoehne M, Schreier E, Richards A, Green J, Brown D, Beard SS, Monroe SS, de Bruin E, Svensson L, Koopmans MP. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses *J Clin Microbiol* 41(4):1423-33, 2003.

Vinjé J. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *J Clin Microbiol* 53 (2): 373-381, 2014.

Vinnard C, Lee I, Linkin D. Successful control of a norovirus outbreak among attendees of a hospital teaching conference. *Am J Infect Control* 40:73-74, 2012.

Vongpunsawad S, Prasad BV, Estes MK. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *J Virol* 87(9): 4818-4825, 2013.

Wadl M, Scherer K, Nielsen S, et al. Food-borne norovirus outbreak at a military base, Germany, 2009. *BMC Infect Dis* 10:30, 2010.

Wang Q, Zhang Z, Saif LJ, Stability of and attachment to lettuce by culturable porcine sapovirus surrogate for human caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 78(11): 3932-3940, 2012.

Wang X, Young W, Shi L, Qiao M, He M, Zhang H, Guo B, Xie G, Zhang M, Jin M, Ding J. An outbreak of multiple norovirus strains on a cruise ship in China, 2014. *J Appl Microbiol* 120(1): 226-233, 2016.

WHO - World Health Organization. World Health Statistics. Geneva: World Health Organization, 2014.

Wikswø ME, Desai R, Edwards KM, Staat MA, Szilanyi PG, Weinberg GA, Curns AT, Lopman B, Vinjé J, Parashar U, Payne DC, Hall AJ. Clinical profile of children with norovirus disease in rotavirus vaccine era. *Emerg Infect Dis* 19(10): 1691-1693, 2013.

Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, Krug A, Mackenzie JM, Green KY, Virgin HW. Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophage. *Plos Biol* 2(12): e432, 2004

Wu W, Yang H, Zhang H, Xian H, Yao X, Zhao J, Chen L, Shu B, Zhou Y, He Y. Surveillance of pathogens causing gastroenteritis and characterization of norovirus and sapovirus strains in Shenzhen, China, during 2011. *Arch Virol* 159:1995–2002, 2014.

Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, DuPont HL, Buscho RF, Thornhill TS, Kapikian AZ, Chanock RM. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross- challenge in volunteers. *J Infect Dis* 129: 709-714, 1974.

Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. NV genome cloning and characterization. *Science* 250: 1580-1583, 1990.

Ye X, Van JN, Munoz FM, Revell PA, Kozinetz CA, Krance RA, Atmar RL, Estes MK, Koo HL. Noroviruses as a cause of Diarrhea in immunocompromised pediatric hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* XX:1-8, 2015.

Yoon JS, Lee SG, Hong SK, Lee SA, Jheong WH, Oh SS, MH, Ko GP, Lee CH, Paik SY. Molecular epidemiology in South Korea in November 2005 through November 2006. *J Clin Microbiol* 46(4):1474-1477, 2008.

Zeng M, Xu X, Zhu C, Chen J, Zhu Q, Lin S, Jie Y, Shu X. Clinical and molecular epidemiology of norovirus infection in childhood diarrhea in China. *J Med Virol* 84(1):145-151, 2012.

Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Karvonen A, Vesikari T. Norovirus gastroenteritis in young children receiving human rotavirus vaccine. *Scand J Infect Dis* 42:540–544, 2010.

Zhang S, Chen TH, Wang J, Dong C, Pan J, Moe C, Chen WC, Yang L, Wang X, Tang H, Li X, Liu P. Symptomatic and Asymptomatic infections of rotavirus, norovirus, and adenovirus among hospitalized children in Xi'an, China. *J Med Virol* 83: 1476-1484, 2011.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346(2): 312-323, 2006.

Zheng DP, Widdowson MA, Glass RI, Vinjé J. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006 *J Clin Microbiol* 48(1): 168-177, 2010.

Zhirakovskaia EV, Tikunov AY, Bodnev AS, Klemesheva VV, Netesov SV, Tikunova N. Molecular epidemiology of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis in children in Novosibirsk, Russia, 2003-2012. *J Med Virol* 87: 740-753, 2015.

Zintz C, Bok K, Parada E, Barnes-Eley M, Berke T, Staat MA, Azimi P, Jiang X, Matson DO. Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States *Infect Genet Evol* 5(3):281-290, 2005.

ANEXOS

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PESQUISA DE VÍRUS NO TRATO RESPIRATÓRIO EM POPULAÇÃO PEDIÁTRICA

Pesquisador: Fabíola Souza Fiaccadori

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 37305314.7.0000.5078

Instituição Proponente: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.210.852

Apresentação do Projeto:

Este projeto constitui um estudo observacional transversal para avaliar a detecção dos vírus do trato respiratório propostos em crianças com infecção respiratória aguda comparando sua detecção em crianças assintomáticas, o qual ainda fornecerá subsídios na avaliação do papel dos Bocavirus Humanos, estudo desenvolvido em projeto paralelo.

A população será constituída por crianças com até cinco anos de idade do sexo feminino e masculino em atendimento no Hospital Materno Infantil de Goiânia, Goiás; em suas unidades de Pronto Socorro e Enfermaria de Pediatria por um período de um ano (05/2014-04/2015). Após o atendimento pelo clínico pediatra, que inclui anamnese e exame físico, o caso será definido como sintomático de infecção respiratória aguda viral (IRA) aquele que apresentar sinais e sintomas, com comprometimento de leve a grave e com início de até cinco dias de febre, coriza/espirros, tosse, dispnéia e sibilância. Para cada caso sintomático, um caso assintomático pareado por data de nascimento (+/- 6 meses) e sexo, será selecionado aleatoriamente a partir de uma lista de potenciais participantes (assintomáticos para infecções respiratórias ou qualquer outra doença infecto contagiosa) no mesmo dia e unidade em que for selecionado o caso sintomático. Uma visita diária do pesquisador será realizada objetivando buscar prováveis casos para atender o tamanho da amostra, que será composta por 400 indivíduos, sendo 200 de casos sintomáticos e 200 de assintomáticos, através da estimativa de prevalência de infecções respiratórias. A

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-000
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8405 E-mail: cep@ufg.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Protocolo: 1.310.883

população atendida neste hospital de referência em pediatria representa a amostragem da população acometida para estas doenças na cidade de Goiânia/ região Centro-Oeste. Seguindo um adequado preenchimento de protocolo do estudo proposto (coleta de dados e fluxo das amostras). As amostras serão coletadas conforme descrito por Lambert e cols (2008). Para os lavados, 1 mL de solução salina estéril será instilada em cada

narina e na sequência aspirado com sonda estéril, armazenando o produto em tubo também estéril e fechado adequadamente. Os swabs serão coletados e armazenados em tubo também estéril contendo meio MEM, fechado e identificado adequadamente. As amostras serão conservadas e transportadas refrigeradas (gelo 4°-8°C) em até duas-quatro horas para o Laboratório de Virologia Humana do IPTSP/UFMG, onde serão imediatamente processadas e estocadas a -70°C, até a realização dos ensaios laboratoriais necessários. Em seguida serão submetidas a triagem molecular utilizando quatro reações de multiplex-PCR para investigação de vírus do trato respiratório.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a prevalência e a relação dos principais vírus do trato respiratório como possíveis agentes etiológicos de infecção aguda do trato respiratório através de um estudo realizado em crianças atendidas no Hospital Materno Infantil de Goiânia, durante o período de um ano.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Será explicado de forma clara e através de figuras como será realizado a coleta da secreção nasal pela pesquisadora responsável, assim como esclarecer riscos e benefícios. Em relação a riscos, para a coleta de secreção nasal, está será através de lavado ou swab nasal realizado pela pesquisadora responsável (Teresinha, médica), podendo ocorrer desconforto e muito raramente pequeno sangramento nasal, sem danos posterior para as crianças. O procedimento de coleta da amostra clínica utilizando swab geralmente é indolor e não provoca sangramento, entretanto, o procedimento pode gerar um leve desconforto. Na ocorrência desse fato, caso a criança se sinta desconfortável, o pesquisador avaliará o tempo para o término do procedimento e a coleta poderá ser interrompida.

Benefícios:

Também será explicado aos pais e/ou responsáveis pelas crianças (objetos de estudos da pesquisa) a importância de sua participação neste estudo visando aumentar o conhecimento a respeito dos vírus respiratórios, onde sua ocorrência nesta população é elevada, por conseguinte, espera-se com nossos resultados a ampliação de medidas mais eficientes de controle para estas infecções, bem como a diminuição do uso desnecessário de medicamentos como antibióticos.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Lásio Universitário CEP: 74.605-000
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3269-8038 Fax: (62)3269-8436 E-mail: cep@ufg.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.310.862

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem descrito, os pesquisadores apresentam formação e qualificação adequadas para o estudo proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatórios estão presentes.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas/UFG - CEP/HCUFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº. 466 de 2012 e na Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Lembramos que o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HCUFG, através de Notificação via Plataforma Brasil, os relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações.

O CEP/HCUFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/10/2014 14:38:22		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Trato Respiratorio.pdf	09/10/2014 14:39:40		Aceito
Outros	Declaração para obter o TCLE.pdf	09/10/2014 14:40:32		Aceito
Outros	Certidão - aprovação IPTSP.pdf	09/10/2014		Aceito

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leite Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8438 E-mail: cep@ufg.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.210.882

Outros	Certidão - aprovação IPTSP.pdf	14:41:26		Aceito
Outros	Curriculo_lattes_pesquisadores.pdf	09/10/2014 14:41:47		Aceito
Outros	Termo de Anuência 1.pdf	09/10/2014 14:42:19		Aceito
Outros	Termo de Anuência 2.pdf	09/10/2014 14:42:30		Aceito
Outros	Termo de Anuência 3.pdf	09/10/2014 14:44:16		Aceito
Outros	Termo_de_compromisso.pdf	09/10/2014 14:45:08		Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_2.pdf	09/10/2014 14:45:32		Aceito
Outros	Questionario aplicado na entrevista.pdf	09/10/2014 14:46:18		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	09/10/2014 14:46:51		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_409276.pdf	09/10/2014 14:54:14		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Trato Respiratorio_versao2.pdf	22/01/2015 11:05:07		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Anuência	TCLE PRORESP_versao2.pdf	22/01/2015 11:05:18		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_409276.pdf	22/01/2015 12:11:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Anuência	TCLE_PRORESP_versao3_07.04.2015. pdf	07/04/2015 16:44:18		Aceito
Outros	Carta_de_atendimento_de_pendências (1).pdf	07/04/2015 16:44:32		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_409276.pdf	07/04/2015 16:44:54		Aceito
Outros	TCLE PRORESP_versao3.pdf	29/07/2015 08:51:08		Aceito
Outros	Carta de atendimento de pendências_2.pdf	29/07/2015 08:51:44		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_409276.pdf	29/07/2015 08:53:30		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: S. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8436 E-mail: cephcufg@yahoo.com.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 1.210.882

Não

GOIANIA, 01 de Setembro de 2015

Assinado por:
JOSE MARIO COELHO MORAES
(Coordenador)

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leite Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8238 Fax: (62)3269-8428 E-mail: cephcutg@yahoo.com.br

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**Termo de consentimento livre e esclarecido**

Título do projeto de pesquisa: Detecção de Bocavírus Humano (HBoV) em crianças com infecção respiratória e/ou gastroenterite: estudo caso-controle.

Pesquisador responsável: Teresinha Teixeira de Sousa

Orientadora: Profa. Divina das Dores de Paula Cardoso.

Nome do sujeito de Pesquisa:.....

Você autoriza a criança a participar de uma pesquisa, em que ela, seu filho (a) ou a criança pela qual você é responsável está sendo convidado (a) como voluntário(a) a fazer parte deste estudo que tem como título: **“Detecção de Bocavírus Humano (HBoV) em crianças com infecção respiratória e/ou gastroenterite: estudo caso-controle”**.

Meu nome é Teresinha Teixeira de Sousa, sou a pesquisadora responsável e minha área de atuação é de médica pneumologista, aluna de doutorado da UFG/IPTSP. A participação da criança é importante, mas antes de decidir se você quer que ela faça parte da pesquisa em que é preciso coletar fezes e secreção do nariz de crianças doentes (com infecções respiratórias e com gastroenterite-diarréia) e também daquelas sem estas doenças (que é o grupo controle, estudar a presença do vírus em quem não está doente), é preciso que o senhor ou a senhora, entenda o motivo da pesquisa: o convite esta sendo feito porque os vírus respiratórios e entéricos são causas comuns de infecções respiratórias e de gastroenterite em crianças.

Vários novos vírus estão sendo descobertos e pouco se conhece sobre seu impacto (importância) em pacientes com essas doenças. Esta pesquisa pretende estudar as infecções respiratórias e gastroenterite por vírus (bocavírus humano/HBoV) em crianças com idades abaixo de 5 anos. Durante o período de um ano atendidas no Hospital Materno Infantil de Goiânia/Goiás. A pesquisa será realizada em crianças com sintomas clínicos (casos) de infecção respiratória e/ou gastroenterite e comparar o vírus também em pacientes sem estas doenças (que é o grupo controle, onde estudamos o vírus também em quem está sadio, pois em alguns casos a criança pode ser portadora dos vírus, mas não manifestar a doença). Após o atendimento do paciente pelos pediatras do hospital, um dos membros da equipe pedirá autorização para os pais e/ou responsáveis pelas crianças e explicará em detalhes todos os procedimentos para a pesquisa: haverá o preenchimento de um questionário e uma coleta de cada material (secreção nasal e fezes), em todas as crianças tanto as doentes como as sadias que estão no hospital por outros motivos. Todos estes procedimentos serão feitos pela pesquisadora responsável (Teresinha, médica) em sala ao lado do ambulatório no térreo e sala procedimentos no segundo andar / enfermarias do Hospital Materno Infantil, onde será garantida a privacidade da criança, por ocasião das consultas e/ou hospitalização, sem a necessidade de comparecimento ou retorno ao Hospital por motivo relacionado à Pesquisa.

Os exames de fezes e secreção nasal não substituirão os exames regularmente colhidos no Hospital como parte do seguimento médico dos pacientes. A participação de seu filho (a) ou a criança pela qual você é responsável é importante, mas você e a criança podem recusar participar da pesquisa a qualquer momento. Os procedimentos apresentam riscos baixos à integridade física da criança, serão realizados pela pesquisadora (Teresinha) e consistem em: Coleta de lavado nasal é feita através de uma pequena sonda com soro fisiológico, introduzida nas narinas e aspirada (como uma

lavagem do nariz com soro, só que aspirado o líquido de volta”), podendo ocorrer desconforto local e muito raramente pequeno sangramento nasal, sem danos posteriormente para a criança. E a coleta de fezes é espontânea, durante a evacuação, a qual será recolhida em um frasco específico, sem a utilização de medicação ou instrumentos para tal. Não acarretando nenhum desconforto direto, podendo ser acompanhado pelo responsável legal da criança. Além da coleta das amostras de secreções nasais e de fezes, o responsável pela criança deverá responder um questionário para o registro das informações pessoais da criança e a pesquisadora poderá, também, anotar dados dos prontuários. O destino dessas amostras será para o Laboratório de Virologia Humano da UFG/IPTSP, onde por exames moleculares os vírus respiratórios e entéricos serão detectados através de técnicas laboratoriais sofisticadas chamadas de PCR em tempo real (material genético dos vírus, DNA e RNA).

Informo, aos pais ou responsáveis pela criança, que as amostras (material biológico de fezes e de secreções nasais) ficarão armazenadas (guardadas) no Instituto de Patologia e Doenças Tropicais da UFG seguindo todas as normas do regulamento aprovado pelo CEP/IPTSP a respeito de biorrepositório (segundo as normas da resolução do CNS 441 de 2011), e, caso eu tenha seu consentimento por escrito autorizando o uso para esta pesquisa e no futuro para qualquer outra pesquisa, não será necessário preencher um novo termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE); sobre o bocavírus humano e também para os outros vírus como o: rotavírus (A), calicivírus, adenovírus, astrovírus, enterovírus, aichivírus, salivírus/klassevírus, vírus respiratório sincicial, vírus influenza A e B, vírus da parainfluenza, adenovírus respiratório, rinovírus, metapneumovírus humano, coronavírus e os H1N1. Esta pesquisa estará sendo financiada com recurso do próprio laboratório e de convênios regularmente firmados sem nenhum custo para o SUS, familiares ou planos de saúde. É importante ressaltar, entretanto que a pesquisa está restrita aos procedimentos listados acima.

A participação no estudo NÃO IMPLICA na realização de outro exame e NÃO INTERFERE nas decisões sobre os remédios necessários para o tratamento do problema atual (o médico do hospital que atender seu filho (a) decidirão por procedimentos necessários, como os medicamentos ou outros exames). Estes dados procedimentos e/ou seus resultados, entretanto serão registrados para análise futura. Todos os pacientes serão convidados a participar do estudo, e a qualquer momento podem também deixar de participar, se assim o desejarem. Somente os pesquisadores e/ou equipe de pesquisa terão conhecimento de suas identidades e do questionário. Os pesquisadores pretendem publicar os resultados obtidos pela pesquisa, mas o nome e dados pessoais dos pacientes são TOTALMENTE CONFIDENCIAIS (não haverá identificação dos participantes) os dados também poderão ser utilizados em estudos futuros de outros vírus citados acima.

Em caso de recusa, você e seu filho (a) não serão penalizados (as) de forma alguma, esta recusa em nada implicará na assistência que seu filho (a) receberá. Se aceitar participar e depois retirar seu consentimento também, em nada será prejudicado. É importante destacar que, como não há despesas decorrentes da participação na pesquisa por parte do sujeito da pesquisa, neste caso, o responsável legal e a criança participante não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela sua participação. Este estudo tem início no ano de 2013 e previsão de encerramento em 2014.

Autorizo o armazenamento e guarda de amostras de secreção nasal e de fezes, formando um banco de dados/biorrepositório para investigações futuras, e que toda nova pesquisa a ser feita com o material será submetida à aprovação do CEP da

instituição e, quando for o caso, da CONEP e com a dispensa de novo consentimento a cada pesquisa (Res. CNS n.º 347/2005-1.1, 1.2, 1.3, 1.4).

Após receber os esclarecimentos e as informações, no caso de aceitar fazer parte do estudo, você deverá rubricar todas as páginas e assinar ao final deste documento e, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. A qualquer momento, antes e durante a pesquisa, você poderá solicitar esclarecimentos e em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Teresinha Teixeira de Sousa no telefone: (62) 81595675. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Materno Infantil de Goiânia Telefone (62) 3201-3374.

Local e Data: Goiânia,/...../.....

Nome e Assinatura do pesquisador _____

Consentimento da participação da criança como sujeito da pesquisa pelo responsável legal

Eu, _____, RG _____, CPF _____, endereço _____, abaixo assinado concordo que _____ cuja responsabilidade legal me é conferida autorizo que a criança participe do estudo **"Detecção de Bocavírus Humano (HBoV) em crianças com infecções respiratórias e/ou gastroenterite: estudo caso-controle"**, como sujeito de pesquisa.

Fui devidamente informado e esclarecido pelo Pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos envolvidos, assim com os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação da criança pela qual sou responsável legal.

Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do seu acompanhamento assistência/tratamento e que todas as informações pessoais obtidas serão mantidas em sigilo. Recebi uma cópia deste documento com todas as páginas rubricadas e assinadas por mim e pelo pesquisador participante deste estudo. Autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo sobre o bocavírus humano e, ainda, a formação de um banco de dados e um biorrepositório das amostras (fezes e de secreções nasais) cujo regulamento foi aprovado pelo CEP/IPTSP/UFG, seguindo as normas da resolução do CNS 441 de 2011. E que as amostras obtidas poderão ser utilizadas em pesquisas futuras sem a necessidade do preenchimento de um novo termo de consentimento (TCLE); para o bocavírus humano e para outros vírus como o: rotavírus (A), calicivírus, adenovírus, astrovírus, enterovírus, aichi vírus, salivírus/klassevírus, vírus respiratório sincicial, vírus influenza A e B, vírus da parainfluenza, adenovírus respiratório, rinovírus, metapneumovírus humano, coronavírus e os H1N1.

Local e data: _____

Nome e assinatura do sujeito ou responsável legal: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas

Nome e assinatura: _____

Nome e assinatura: _____

Anexo 3. Ficha de Investigação Clínica

Ficha de investigação clínica.

DATA:/...../..... Registro geral (.....) N° Amostra
(.....)

- | | | | |
|----|-----------|-----------------------------|--------------------------------|
| 1. | Controle: | 1.1 Fezes assintomático () | 1.2 Swab assintomático () |
| 2. | Caso: | 2.1 Sintomas GEA () | 2.2 Sintomas respiratórios () |
| 3. | Amostra: | 3.1 Fezes () | 3.2 Swab () |

Dados epidemiológicos

4. NOME:
5. COLETA: DATA (...../...../.....) HORA (.....)
6. UNIDADE COLETA: () PS () ENFERMARIA ADMISSÃO:
7. SEXO: () MASC. () FEM.
8. DATA DE NASCIMENTO:/...../..... IDADE:
9. Natural: Procedência:

Endereço:

Bairro:..... Cidade:..... UF:.....

Telefone: ()..... Nome responsável:

Profissão: Mãe Pai.....

Renda familiar (em salário mínimo):

Habitação: () própria () alugada

Asfalto: sim() não() Água: () tratada () cisterna () poço Esgoto: sim() não()

10. RAÇA/COR: () branca, () morena, () negra, () indígena
11. ESCOLARIDADE: () pública, () creche, () particular
12. ASSISTÊNCIA MÉDICA: () SUS, () plano de saúde, () particular
13. ALIMENTAÇÃO: () leite materno, () leite materno e outro, () outro
14. TIPO PARTO: () normal, () cesariana

Sintomatologia:

15. A. Respiratório:

Febre: sim() não(), Tosse () sim () não, Dispnéia/Chiado () sim () não

SaO2:...../ Rad TX:...../ HMG:

Ausculta:/ Temperatura:

B. GASTROENTERITE:

Diarréia: sim() não()/ Frequência: 1 a 2x (), >2x ()

Aspecto: líquida(), semi-líquida(), pastosa(), sangue(), fétida()

Febre: sim() não()/ Vômitos: sim() não()/ Dor abdominal: sim() não()

Antecedentes epidemiológicos:

16. Contato caso suspeito (Respiratório e/ou GEA): () domicílio, () creche, () escola

17. Uso de medicação antes coleta: sim() não(), qual?
18. Vacinação completa: sim() não()
Vacina contra gripe: sim() não() Última dose:.....
Vacina rotavírus (VORH)(), Rotarix (), Rotatec() – 1ªdose(), 2ªdose ()
Comprovação: sim(), não()
19. Diagnóstico clínico prontuário:.....
20. Outras patologias/cirurgias: