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

LUCIANNA GONÇALVES NEPOMUCENO LEMES

# ESTUDO PROSPECTIVO DE INFECÇÃO POR CALICIVÍRUS (NOROVÍRUS E SAPOVÍRUS) EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS

Goiânia
2013

sistema de bibliotecas ufg

UFG

# 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:** **[X] Dissertação** **[ ] Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Autor (a): | Lucianna Gonçalves Nepomuceno Lemes | | | | |
| E-mail: | lugnlemes@hotmail.com | | | | |
| Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? | [ ] Sim | [X] Não | | | |
| Vínculo empregatício do autor | Secretaria Municipal de Anápolis | | | | |
| Agência de fomento: | Não possui | | | Sigla: | |
| País: | | UF: | | CNPJ: | |
| Título: | Estudo prospectivo de infecção por calicivírus (norovírus e sapovírus) em pacientes submetidos a transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas. | | | | |
| Palavras-chave: | calicivírus, norovírus, sapovírus, transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas, doença do enxerto contra hospedeiro. | | | | |
| Título em outra língua: | Prospective study of calicivírus infection (norovirus and sapovírus) in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation | | | | |
| Palavras-chave em outra língua: | calicivirus, norovirus, sapovirus, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, graft versus host disease. | | | | |
| Área de concentração: | Microbiologia | | | | |
| Data defesa: (dd/mm/aaaa) | 20/12/2013 | | | | |
| Programa de Pós-Graduação: | Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro | | | | |
| Orientador (a): | Menira Borges de 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 [X] SIM [ ] NÃO[1]

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.

Lucianna G. N. Lemes

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 14 / 02 / 14

[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.

LUCIANNA GONÇALVES NEPOMUCENO LEMES

# ESTUDO PROSPECTIVO DE INFECÇÃO POR CALICIVÍRUS (NOROVÍRUS E SAPOVÍRUS) EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS

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

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Menira Borges de Lima Dias e Souza.

Goiânia
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**
**GPT/BC/UFG**

L552e

Lemes, Lucianna Gonçalves Nepomuceno.
Estudo prospectivo de infecção por calicivírus (norovírus e sapovírus) em pacientes submetidos a transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas [manuscrito] / Lucianna Gonçalves Nepomuceno Lemes. - 2013.
76 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Menira Borges de Lima Dias e Souza.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2013.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.
Apêndices e anexos.

1. Calicivírus. 2. Células progenitoras hematopoiéticas – Transplante alogênico. 3. Doença do enxerto contra hospedeiro. I. Título.

CDU: 616.34-002.2

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

# BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Aluna: Lucianna Gonçalves Nepomuceno Lemes**

**Orientadora: Profª. Drª. Menira Borges de Lima Dias e Souza**

## Membros:

1. **Profª. Drª. Menira Borges de Lima Dias e Souza**
2. **Profª. Drª. Fabíola Souza Fiaccadori**
3. **Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite**

**Data: 20/12/2013**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, porque sei que Ele esteve comigo em todos os momentos. Aos meus pais, pelo apoio, ensinamentos, dedicação e amor. E ao meu esposo, pelo carinho, atenção, paciência e companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora deste trabalho, Drª. Menira Borges de Lima Dias e Souza, pelo acompanhamento, correções, apoio, dedicação e amizade.

Às professoras Drª. Fabíola Souza Fiaccadori, Drª. Keli Maria Cardoso de Souza, pela ajuda, sugestões e colaboração neste trabalho, e Drª. Fátima Ribeiro Dias, pelo incentivo e conselhos.

Ao Dr. Adriano de Moraes Arantes, médico hematologista do Hospital Araújo Jorge, pela grande colaboração na realização deste projeto.

À enfermeira Larissa Pereira e Silva, chefe da Unidade de Transplante de Medula óssea do Hospital Araújo Jorge, pela enorme cooperação, sem a qual não seria possível a concretização deste trabalho e, principalmente pela amizade.

Ao professor Dr. José Paulo Gagliardi Leite que se dispôs a vir do Rio de Janeiro e participar da banca examinadora deste trabalho.

Aos amigos do laboratório Tâmera Nunes Vieira de Almeida, Vanessa Neiva Guimarães, Marielton dos Passos Cunha, Ítalo de Araújo Castro, Thaís Santos Corrêa e Hugo César Pereira, pela amizade, apoio e, principalmente, pela grande colaboração na execução deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos, por estarem sempre ao meu lado me apoiando.

À minha amiga Denisy Marques Mendanha, que esteve ao meu lado sempre, pela grande amizade, incentivo e por ter me ajudado imensamente na realização deste trabalho.

Ao meu esposo, presente de Deus na minha vida, por todo apoio, paciência e amor.

A Deus, por ter permitido a realização de mais uma etapa importante na minha vida.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), ao CNPq e ao Programa Biologia da Relação-Parasito Hospedeiro, pelo apoio financeiro ao trabalho.

**SUMÁRIO**


**1 - INTRODUÇÃO ..... 11**
**1.1 - Histórico ..... 11**
**1.2 - Estrutura viral e organização genômica ..... 12**
**1.3 - Taxonomia/ Classificação ..... 14**
**1.4 - Propriedades biológicas ..... 15**
**1.5 - Vias de transmissão, patogenia e características clínicas .... 16**
**1.6 - Diagnóstico ..... 17**
**1.7 - Imunidade, susceptibilidade e resistência ..... 20**
**1.8 - Epidemiologia ..... 23**
**1.9 - Prevenção, controle e tratamento ..... 26**
**1.10- Transplante de células progenitoras hematopoiéticas, doença do enxerto contra o hospedeiro e a infecção por calicivírus..... 28**

**2 - JUSTIFICATIVA ..... 31**

**3 - OBJETIVOS ..... 32**
**3.1- Geral ..... 32**
**3.2- Específicos ..... 32**

**4 - MATERIAL E MÉTODOS ..... 33**
**4.1- População de estudo ..... 35**
**4.2- Material de estudo ..... 35**
**4.3- Metodologia ..... 35**
**4.3.1- Processamento das amostras coletadas ..... 35**
**4.3.2- Determinação do grupo sanguíneo e fenótipo secretor ..... 36**
**4.3.3- Detecção e caracterização molecular de NoV e SaV ..... 37**
**4.3.4- Sequenciamento genômico e análise filogenética das amostras positivas para NoV ..... 38**

**5- RESULTADOS ..... 40**
**5.1- Características gerais da população estudada ..... 40**
**5.2- Principais sintomas e intercorrências sofridos pelos pacientes infectados por NoV ..... 43**
**5.3- Sequenciamento genômico e análise filogenética das amostras positivas para NoV ..... 46**

**6- DISCUSSÃO ..... 48**

**7- CONCLUSÕES ..... 56**

**8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 57**

**9- APÊNDICES E ANEXOS ..... 71**

## SIGLAS E ABREVIATURAS

AGSH – antígenos do grupo sanguíneo humano

cDNA – *complementary DNA* – DNA complementar

CV – calicivírus

CaCV – *canine calicivirus* – calicivírus canino

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* – Centro de Controle e Prevenção de doenças

DECH – doença do enxerto contra hospedeiro

DNA – *deoxyribonucleic acid* – ácido desoxirribonucleico

EIE – *enzyme Immunoassay* – ensaio imunoenzimático

FCV – *feline calicivirus* – calicivírus felino

FUT2 – alfa-1,2 fucosiltransferase

ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses* – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

IME- imunomicroscopia eletrônica

Kb – kilobase

ME- microscopia eletrônica

MNV – *murine norovirus* – norovírus murino

NoV – norovírus

nm – nanômetros

NV – *Norwalk virus* – vírus Norwalk

PBS– *phosphate buffered saline* – tampão fosfato salina

ppm – partes por milhão

pH – potencial hidrogeniônico

PCR – *polymerase chain reaction* – reação em cadeia pela polimerase

RIA- *radioimmunoassay* – radioimunoensaio

RLA – *open reading frames* – região de leitura aberta

RNA – *ribonucleic acid* – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

RpRd– RNA polimerase RNA dependente

RT-PCR – *reverse transcription-polymerase chain reaction* – reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa

SaV – sapovírus

$Se^+$ – secretor

$Se^-$ – não secretor

TACPH – transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas

TCPH – transplante de células progenitoras hematopoiéticas

UV – ultravioleta

VLP – *virus-like particles* – partículas semelhantes ao vírus

VPg – *viral protein genome-linked* – proteína ligada ao genoma

µL – microlitro

## FIGURAS, TABELAS, GRÁFICOS, ANEXOS

### LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação esquemática da organização genômica dos NoV e SaV ..... 13
**Figura 2.** Representação esquemática das regiões do genoma dos NoV utilizadas para genotipagem ..... 19
**Figura 3.** Representação esquemática da organização espacial da UTMO do HAJ/ACCGO ..... 34
**Figura 4.** Análise filogenética de uma sequência parcial (330pb) do capsídeo dos norovírus (região C) ..... 47

### LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Características gerais referentes aos pacientes submetidos ao TACPH.. ..... 41
**Tabela 2.** Dados relacionados ao TACPH, à positividade para NoV e à DECH ..... 42

### LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Duração da detecção de RNA viral no soro e nas fezes ..... 44
**Gráfico 2.** Ordem cronológica da positividade para NoV, nos seis pacientes submetidos ao TACPH. ..... 45

### LISTA DE APÊNDICES E ANEXOS

**Apêndice 1.** Termo de consentimento livre e esclarecido ..... 71
**Apêndice 2.** Ficha de investigação clínica ..... 73
**Anexo 1.** Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG ..... 74
**Anexo 2.** Parecer do Comitê de Ética do HAJ/ACCGO ..... 77

## RESUMO

Os calicivírus (norovírus e sapovírus) são importantes agentes etiológicos da gastroenterite aguda. Estudos recentes mostram que em pacientes imunocomprometidos, como os submetidos a transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas (TACPH), a infecção por norovírus pode levar ao agravamento dos sintomas e ser confundida com quadro clínico da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Entretanto, a triagem para calicivírus não é realizada, rotineiramente, como parte dos exames laboratoriais de acompanhamento destes pacientes. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de norovírus (NoV) e sapovírus (SaV) em pacientes que foram submetidos ao TACPH e proceder à caracterização molecular das amostras positivas para estes vírus. Foram obtidas amostras de fezes, coletadas semanalmente, e de soro, a cada quinze dias, de dez pacientes que realizaram o TACPH, por um período mínimo de cinco meses e máximo de um ano. O fenótipo secretor dos pacientes foi determinado utilizando um teste imunoenzimático e a pesquisa de calicivírus foi realizada pela RT-PCR, utilizando-se iniciadores específicos para uma região parcial do gene codificante para a proteína dos capsídeos dos NoV do genogrupo I e II (GI e GII) e dos SaV. Os amplicons das amostras positivas foram submetidos ao sequenciamento genômico e análise filogenética. Os resultados obtidos revelaram que de dez pacientes participantes do estudo, oito apresentaram diarreia e vômito. Dentre esses, seis (60%) apresentaram amostras positivas para NoV, sendo que todos foram identificados como secretores. O período de excreção de NoV nas fezes variou de cinco a 143 dias. Foi também detectado RNA viral nas amostras de soro, variando de 29 a 36 dias, em cinco pacientes infectados por NoV. Três, dos seis pacientes, apresentaram DECH aguda intestinal. Através do sequenciamento genômico e análise filogenética, todas as amostras positivas para NoV, de todos os pacientes, foram caracterizadas como genótipo GI.3 dos NoV, e como foi comprovada elevada identidade nucleotídica entre elas, foram caracterizadas como um único haplótipo. Os dados obtidos ressaltam a urgente necessidade da inclusão da pesquisa de calicivírus na rotina de exames realizados antes do transplante, bem como durante o acompanhamento destes pacientes. Este é o primeiro relato da ocorrência de NoV em pacientes submetidos ao TACPH no Brasil.



**Palavras-chave:** calicivírus, norovírus, sapovírus, transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas, doença do enxerto contra hospedeiro.

## ABSTRACT

The calicivirus (norovirus and sapovirus) are important etiologic agents of acute gastroenteritis. Recent studies show that in immunocompromised patients such as those undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), norovirus infection can lead to worsening of symptoms and be confused with clinical symptoms of graft versus host disease (GVHD). However, calicivirus screening is not performed, routinely, as part of the patients' follow-up laboratory exams. The main objective of this study was to evaluate the occurrence of norovirus (NoV) and sapovirus (SaV) in patients who underwent HSCT, and to conduct the molecular characterization of the samples positive for these viruses. Fecal samples were collected weekly, and serum samples were obtained every two weeks of ten patients who underwent HSCT, for a minimum period of five months and a maximum of one year. The secretor status was determined by an enzyme immunoassay and the detection of calicivirus was performed by RT-PCR using primers specific for a partial region of the gene encoding the NoV genogroup I and II (GI and GII) and SaV capsid protein. The genomic sequencing was performed for positive samples. The results showed that from ten patients participating in the study, eight had diarrhea. Among these, six (60%) had positive samples for NoV, and all of them had a secretor phenotype. The duration of NoV excretion in feces ranged from five to 143 days. Viral RNA was also detected in serum specimens, ranging from 29 to 36 days in the five patients infected with NoV. Three of the six patients had acute intestinal GVHD. Through genomic sequencing and phylogenetic analysis all NoV-positive samples were characterized as genotype GI.3, and because they had a high nucleotide identity, they were all characterized as a single haplotype. The data highlight the urgent need of the inclusion of calicivirus screening in the routine testing performed before transplantation and during follow-up of these patients. This is the first report of the occurrence of NoV in patients undergoing HSCT in Brazil.



***Keywords:*** calicivirus, norovirus, sapovirus, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, graft versus host disease.

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Histórico

Estudos em voluntários humanos, realizados nas décadas de 40 e 50, nos Estados Unidos e Japão, foram determinantes para a descoberta de que agentes infecciosos não bacterianos e filtráveis poderiam causar gastroenterite. Esses estudos foram realizados por meio da administração por via oral, de filtrados fecais livres de bactérias, provenientes de indivíduos doentes a voluntários saudáveis que, posteriormente, desenvolviam a doença. Entretanto, por décadas a etiologia desta gastroenterite aguda permaneceu indefinida, devido à natureza fastidiosa destes agentes para se propagar em sistema de cultura de células (Green 2007).

Em 1968, um surto de gastroenterite aguda ocorreu entre alunos e professores em uma escola de ensino primário em Norwalk, Ohio e os sintomas associados ao surto eram semelhantes aos da “winter vomiting disease”, caracterizada por náuseas e vômitos em 90% e diarréia em 38% dos indivíduos afetados, com duração dos sintomas de 12 a 24 horas (Adler & Zickl 1969). A partir da análise de amostras fecais provenientes deste surto, foram observadas, ao microscópio eletrônico, partículas virais classificadas como “small round-structured viruses” e designadas “Norwalk virus” por Kapikian et. al (1972). Estas amostras foram armazenadas e posteriormente utilizadas, na forma de filtrados fecais, para desafiar voluntários humanos. As amostras desses foram então examinadas, por imunomicroscopia eletrônica (IME), sendo detectada a presença das partículas virais, confirmando assim a transmissão do vírus Norwalk pela via fecal-oral e esclarecendo a etiologia da diarreia nestes casos (Green 2007).

Os vírus com características genéticas e antigênicas semelhantes ao agente inicialmente designado “Norwalk virus” foram posteriormente denominados norovírus- NoV (ICTV, 2012). Em 1977, outro surto de gastroenterite ocorreu em um orfanato na cidade de Sapporo, Japão, onde também se observou por IME a presença de um vírus morfologicamente

semelhante aos NoV em amostras fecais de crianças afetadas, entretanto, geneticamente distinto dos NoV, designado “Sapporo vírus”. No entanto, este se apresentou antigenicamente diferente daquele e recebe atualmente a denominação de sapovírus- SaV (Chiba et al. 1979, ICTV 2012).

Na década de 80, novos estudos com voluntários humanos foram realizados a partir de amostras fecais contendo partículas de NoV e SaV, ambos incluídos no grupo dos calicivírus (CV), a fim de se obter um maior número de partículas virais para caracterização inicial do genoma. As partículas virais foram então purificadas e o genoma foi clonado, amplificado e sequenciado, resultando em grande avanço na identificação e caracterização molecular destes agentes (Xi et al. 1990). Estes estudos foram também determinantes para fornecer as primeiras informações sobre susceptibilidade e resistência a estes agentes, bem como para o início da compreensão dos mecanismos de imunidade aos CV (Matsui & Greenberg 2000; Tan & Jiang 2005; Debbink et al. 2012).

## 1.2 - Estrutura viral e organização genômica

As partículas dos CV medem cerca de 27 a 40 nanômetros (nm) de diâmetro e não possuem envelope, sendo o capsídeo viral, de simetria icosaédrica, constituído por uma maior quantidade de proteína VP1 e uma menor quantidade de proteína VP2 (Prasad et al. 1999; Glass et al. 2000).

O genoma dos CV é composto por RNA fita simples (ssRNA) de polaridade positiva, poliadenilado na extremidade 3’, de 7,4 a 8,3 Kb (Xi et al., 1990). O genoma dos NoV apresenta três regiões de leitura aberta (RLA), as quais codificam para as proteínas estruturais e não estruturais. A RLA1, na extremidade 5’, representa em torno de 5 Kb, dois terços do genoma, e é responsável pela codificação da poliproteína de aproximadamente 200 KDa, a qual é autoprocessada por uma protease viral para dar origem às proteínas não estruturais envolvidas na transcrição e replicação. O terço final do genoma compreende RLAs que codificam para proteínas estruturais: RLA2 (1,8 Kb) codifica para VP1 e a RLA3 (0,6 Kb), na extremidade 3’, para VP2 (Hardy 2005).

O genoma dos SaV pertencentes aos genogrupos GI, GIII, GIV e GV contêm três RLAs, enquanto o genogrupo GII contém apenas duas RLAs. A RLA1 codifica para todas as proteínas não estruturais, incluindo RNA-polimerase RNA dependente (RpRd) e a principal proteína estrutural do capsídeo, VP1. A RLA2, para uma proteína menor, similar à VP2 dos NoV e a RLA3, para uma proteína ainda de função desconhecida (Clarke & Lambden 2000). A figura 1 mostra a organização genômica dos NoV e dos SaVs genogrupo GII.

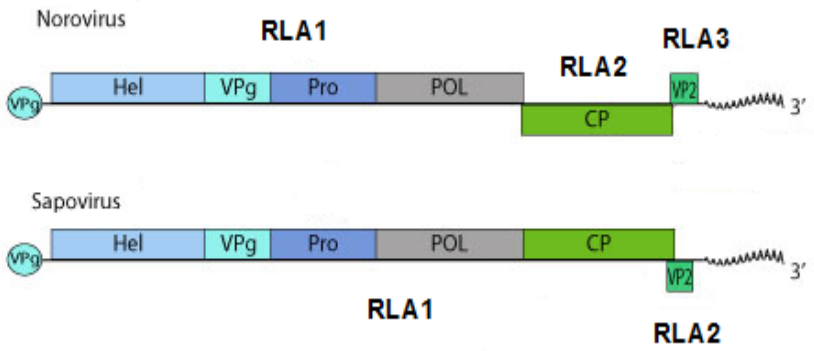


**Figura 1**. Representação esquemática da organização genômica dos norovírus e sapovírus. Fonte. Disponível em: http:Viralzone.expasy.org/all_by_species/32.html, acesso em 28/11/2013**.**

Os vírions dos CV são constituídos por três proteínas estruturais: VP1, VP2 e VPg (Hardy 2005). O capsídeo dos CV é composto por 180 moléculas de VP1, organizada em 90 dímeros que formam dois domínios: o domínio *shell* (S) e o domínio *protruding* (P). O domínio S forma a parte interna do capsídeo que contém o genoma e é, portanto, relativamente uma região com sequência de aminoácidos mais conservada entre os CV, quando comparável à parte externa do capsídeo; e o domínio P projeta-se da superfície do capsídeo viral e é mais variável na sequência de aminoácidos, sendo subdividido em subdomínios P1 e P2 (Prasad et al. 1999). O subdomínio P2 corresponde à região de VP1 mais variável entre os CV, parecendo exercer um importante papel na interação patógeno-hospedeiro, e possível evasão do sistema imune (Donaldson et al. 2008; Lindesmith et al. 2008; Donaldson et al. 2010; Lindesmith et al. 2012).

A VP2 representa a menor proteína estrutural dos vírions, a qual atua na encapsidação do RNA viral e na montagem do vírus. Além disso, a VP2

parece aumentar a eficiência da expressão da proteína VP1, bem como sua estabilidade, diminuindo a degradação de VP1 por proteases, durante a montagem do capsídeo (Jiang et al. 1993; Glass et al. 2000). A VPg está covalentemente ligada ao genoma viral na extremidade 5´, e é o menor componente dos vírions, com uma ou duas cópias por partícula (Sosnovtsev & Green 2000). Embora VPg esteja presente no vírion, ela possui provavelmente função primária de proteína não estrutural, atuando durante a replicação. A clivagem de uma poliproteína resulta nas proteínas não estruturais: proteína N-terminal, nucleosídeo trifosfatase, p22, 3CL protease, RNA polimerase e a proteína VPg, as quais são essenciais nos processos de transcrição e replicação viral (Seah et al. 2003).

## 1.3 - Taxonomia e classificação

Os primeiros CV estudados foram os associados a doenças em felinos, causadores predominantemente de doença respiratória, que foram isolados pela primeira vez a partir de cultura celular em 1957 na Nova Zelândia (Fastier 1957). Esses agentes foram inicialmente classificados na família *Picornaviridae*. Contudo, a estrutura, replicação e propriedades físico-químicas dos CV são diferentes das dos picornavírus e, em 1978, houve a retirada dos CV dessa família (Green 2007). No terceiro relatório do Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV), em 1979, foi divulgada a criação de uma nova família para os CV, denominada *Caliciviridae*, nome derivado da palavra latina “calix”, que significa copo ou cálice e refere-se às depressões em forma de cálice visíveis na superfície dos CV, ao microscópio eletrônico (Kapikian et al 1972; Matthews 1979; Green et al. 2000).

A família *Caliciviridae* é composta por cinco gêneros: *Norovirus* *Sapovirus*, ambos causadores de gastroenterite aguda em humanos. Os outros gêneros que compõem a família: *Lagovirus, Vesivirus* e *Nebovirus* são patogênicos para diversas espécies de animais como coelhos, gatos e bovinos, respectivamente, dentre outros (ICTV 2012).

O gênero *Norovirus* é ainda subdividido em cinco genogrupos (GI-GV), com base na sequência de nucleotídeos de uma região parcial do gene

que codifica para a principal proteína viral estrutural (VP1) e com base em sequências codificantes para a polimerase viral. Os vírus pertencentes aos genogrupos GI, GII e GIV infectam humanos, já os dos genogrupos GIII e GV infectam bovinos e camundongos respectivamente (Zheng et al. 2006). Os NoV podem ainda ser classificados em *clusters* genômicos, constituídos, por pelo menos 35 genótipos, sendo oito pertencentes ao GI, 21 ao GII, três ao GIII, dois ao GIV e um ao GV (Zheng et al. 2006; CDC 2011). Os SaV também são divididos em cinco genogrupos (GI-GV), sendo os genogrupos GI, GII, GIV e GV capazes de infectar humanos, enquanto GIII infecta suínos. Os genogrupos GI e GII podem ainda ser subdivididos em sete genótipos (Oka et al. 2012).

## 1.4 - Propriedades biológicas

As partículas do vírus Norwalk (variante protótipo dos norovírus GI.1) apresentam uma densidade de 1,33 a 1,41 g/ $cm^3$ em cloreto de césio. Os vírions permanecem infecciosos em potencial hidrogeniônico (pH) ácido a 2,7 por três horas em temperatura ambiente; tratamento com éter a 20%, a 40°C por 18 horas; incubação a 60°C por 30 minutos (Dolin et al. 1972; Kapikian et al. 1973) e são resistentes à inativação com tratamento na concentração de 3,75 a 6,25 mg/L com cloro. Contudo, podem ser inativados com uma concentração de cloro a 10 mg/L, concentração adotada apenas quando se detecta alguma contaminação na água, a qual é dez vezes superior à concentração de cloro residual livre na água tratada (0,5 - 1 mg/L) (Green 2007).

Para uma melhor compreensão das propriedades biológicas dos CV que infectam humanos, diversos experimentos são realizados com os CV que infectam os animais, visto que alguns CV animais podem ser cultivados *in vitro* e os que infectam humanos não (Atmar & Estes 2001; Duizer et al. 2004; Papafragkou et al. 2013), no entanto, deve-se ter cautela na aplicação dessas informações sobre CV animais aos CV que infectam humanos.

Calicivírus felino (FeCV) e canino (CaCV) permaneceram infeccisosos por muito tempo à temperatura ambiente quando incubados em suspensão celular, foram resistentes à inativação por cloro numa quantidade maior que

300 partes por milhão (ppm) e ao etanol a 70%, a inativação por calor variou entre 37 e 100°C, por radiação UV-B, de 280- 300 nm. Entretanto, os FeCV e CaCV mostraram-se sensíveis a potencial hidrogeniônico (pH) abaixo de 3 e acima de 9, sendo completamente inativados quando expostos a pH 2 por 30 minutos (Duizer et al. 2004). O modelo de NV murino (MNV), no entanto, apresentam resistência a um pH variando entre 2-10 (Cannon et al. 2006), de modo semelhante aos NoV que infectam humanos, como observado por Dolin et al. (1972), que realizaram estudos com o agente Norwalk e verificaram que esse era resistente à inativação quando submetido por três horas a pH 2,7, em temperatura ambiente. Há estudos, no entanto, que mostram que os MNV e os FeCV são sensíveis ao etanol em diferentes concentrações, com uma redução considerável da carga viral (Macinga et al. 2008; Shimizu-Onda et al. 2013), diferenciando dos NoV humanos, os quais permanecem viáveis após o tratamento com etanol a 70 % (Liu et al. 2010).

## 1.5 - Vias de transmissão, patogenia e características clínicas

Os CV que infectam humanos são predominantemente transmitidos pela via fecal-oral por meio do contato direto com fezes ou da ingestão de água e alimentos contaminados (Koopmans & Duizer 2004; Green 2007), mas podem também ser transmitidos por contato pessoa-pessoa e via ingestão de partículas provenientes de aerossóis formados pelo vômito de pessoas doentes (Marks et al. 2000; 2003).

Após adentrarem o organismo pela via oral, os vírions, por serem ácido-resistentes, conseguem sobreviver à passagem pelo estômago chegando até o trato intestinal. O período de incubação desses vírus varia de 24- 48 horas, a doença é branda e autolimitada e os sintomas duram de 12 a 60 horas em indivíduos imunocompetentes (Kaplan et al. 1982). Crianças, idosos e pessoas hospitalizadas e/ou imunocomprometidos, no entanto, podem apresentar excreção viral prolongada e doença grave por CV (Koopmans et al. 2008; Bok & Green 2012).

Com base em estudos em animais de laboratório e voluntários humanos, utilizando como inóculo o agente Norwalk, o sítio de replicação primário para os CV humanos é o trato intestinal superior. Biópsias do jejuno

de voluntários exibem lesões histopatológicas como o alargamento e achatamento das vilosidades do intestino delgado proximal, infiltrado de células mononucleares e vacuolização citoplasmática, embora a mucosa permaneça histologicamente intacta (Cheetham et al. 2006; Green 2007). Esta inflamação do trato intestinal causa manifestações clínicas caracterizadas por náusea, vômitos, diarreia, dores abdominais, mal-estar, cefaleia, mialgia, dores de garganta e febre. Os sintomas mais comuns são: náusea, vômito e diarreia. A diarreia é normalmente aquosa, sem muco, sangue ou leucócitos (Rockx et al. 2002).

## 1.6 - Diagnóstico

As manifestações clínicas da doença, em humanos, causadas pelos CV não são suficientes para permitir um diagnóstico conclusivo. Porém, em situações de surtos, onde não é possível a avaliação microbiológica, podem-se utilizar alguns critérios, como: ausência de patógenos bacterianos e parasitários; vômito em mais de 50% dos casos; duração da doença de 12 a 60 horas e um período de incubação de 24 a 48 horas (Kaplan 1982). Portanto o diagnóstico da infecção por CV deve-se basear em metodologias laboratoriais e, diferentes técnicas podem ser utilizadas, como a observação da partícula viral em amostras clínicas, na detecção de antígenos virais, e na amplificação e detecção do genoma viral.

A microscopia eletrônica (ME) permite a visualização e caracterização morfológica de partículas virais a partir de amostras clínicas, no entanto, essa técnica requer a presença de elevada carga viral nas fezes, microscopista altamente qualificado e equipamentos de alto custo (Doane 1994). Assim, essa técnica é inviável para a realização de grandes estudos epidemiológicos e clínicos. A IME consiste na observação de imunocomplexos formados pelo antígeno virais, presentes nas amostras fecais positivas, e um anticorpo de referência. Essa técnica, entretanto, detecta apenas um terço das amostras fecais de indivíduos afetados (Kaplan et al. 1982). Dessa forma, avanços na técnica de IME ocorreram para melhorar a sensibilidade desta, por meio da utilização da imunomicroscopia de fase sólida, que consiste no revestimento de uma “grade” com anticorpos

específicos para os CV, que capturam as partículas virais se essas estiverem presentes nas amostras. Estas técnicas são mais sensíveis que a ME, mas são técnicas trabalhosas cuja execução demanda muito tempo (Atmar & Estes 2001).

Dentre os testes que detectam CV, há ainda o teste de imunocromatografia (teste rápido), o qual apresenta sensibilidade e especificidade avaliadas em 79-96% e 74-100%, respectivamente (Nguyen et al 2007; Khamrin et al 2008). Os Kits comerciais ou testes "In house" de ensaio imunoenzimático (EIE) caracterizam-se por ser de fácil execução, e, de uma maneira geral, apresentam sensibilidade que varia de 30-90% e especificidade entre 88 % e 96% e, portanto, não detectam todos os CV (Burton-MacLeod et al. 2004; Bruin et al. 2006). Os ensaios imunocromatográficos e de EIE são recomendados apenas para uma triagem inicial, em caso de surto epidêmico, devendo os resultados negativos serem confirmados por metodologia molecular (Khamrin et al. 2009, CDC 2011)

Com o desenvolvimento dos métodos moleculares na década de 90, e o constante aperfeiçoamento das técnicas moleculares para amplificar e caracterizar genomas de patógenos tornou-se possível a caracterização genômica dos CV que infectam humanos. A reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR) tem sido a técnica mais utilizada para a detecção e amplificação de regiões parciais do genoma de CV em amostras clínicas, de alimentos e ambientais. A RT-PCR é considerada método padrão ouro para o diagnóstico dos CV (Bruin et al. 2006; CDC 2011), e a sua sensibilidade depende da escolha da região alvo dos iniciadores, devido à diversidade genética dos CV (Jiang, et al. 1999; George et al. 2012). Entretanto, o sequenciamento do genoma completo de alguns CV, que infectam humanos, vem permitindo o desenvolvimento de pares de iniciadores cada vez mais específicos para a detecção e genotipagem destes vírus.

Quatro diferentes regiões do genoma: A, B, C e D têm sido utilizadas para a caracterização molecular dos CV. A região genômica, primeiramente utilizada, para detectar os CV que infectam humanos pela RT- PCR, codifica para o gene da RNA-polimerase RNA dependente RpRd (regiões A e B), a

qual é relativamente conservada em ambos os gêneros *Norovirus* e *Sapovirus* (Jiang et al. 1999). Entretanto, com o intuito de avaliar a diversidade genética dos CV, iniciadores para outras regiões do genoma foram desenvolvidos. Para os NoV, iniciadores foram desenvolvidos para a genotipagem de amostras pertencentes aos genogrupos I e II: extremidade 3' final da RLA1 (região B) (Fankhauser et al. 2002), extremidade 5,' final da RLA2, que tem como alvo a proteína VP1 (região C) (Kojima et al. 2002) e o domínio P da proteína VP1 (região D) (Vinjé et al. 2004) (Figura 2). Embora as sequências da região C sejam amplamente utilizadas para genotipagem dos NoV, esta região não permite distinguir as diferenças entre certas variantes, principalmente pertencentes a GII.4, as quais são predominantes nos surtos (Zheng et al. 2010). Assim, os laboratórios que participam da rede de vigilância dos NoV, em diferentes partes do mundo, utilizam como alvo, preferencialmente, a região D (CDC 2011).

Variações da técnica de RT-PCR podem também ser utilizadas, como a Nested RT-PCR, que utiliza pares de iniciadores que têm como alvo regiões mais internas, em relação ao par que amplifica a região consensual (Kittigul at al. 2012; Lee et al. 2010). A técnica de RT-PCR Multiplex para detecção simultânea e quantificação de NoV dos genogrupos GI e GII, mostrou-se um método rápido, sensível e de bom custo-benefício para detecção de infecção por NoV em surtos e casos esporádicos. A RT-PCR multiplex consiste na utilização de um grupo de pares de iniciadores, permitindo a caracterização dos genogrupos (I e II) dos NoV e SaV, e ainda que mais de um tipo de vírus RNA causador de gastroenterite, como, por exemplo, CV e astrovírus, sendo também detectados (Kojima et al. 2002; Yan et al. 2003).

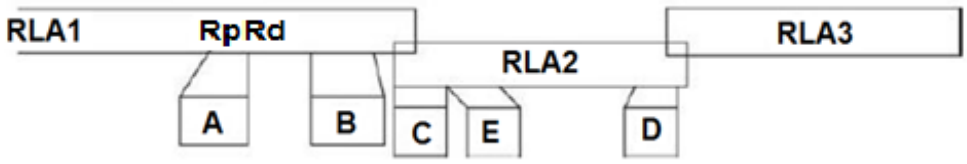


**Figura 2.** Representação esquemática das regiões do genoma dos norovírus utilizadas para a genotipagem. Siebenga et al. 2009, com modificações. RNA polimerase RNA dependente; RLA- região de leitura aberta.

Mais recentemente, a RT-PCR em tempo real, que utiliza fluoróforos intercalantes de DNA fita simples, como o SYBR GREEN ou sondas marcadas como o TAq Man, vêm sendo utilizado para a determinação do número de copias genômicas dos CV por meio da emissão de fluorescência por esses compostos que é diretamente proporcional à quantidade de produto formado na reação. Esta metodologia apresenta alta especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade, permitindo o monitoramento em tempo real da quantidade de CV em amostras clínicas e até mesmo em amostras alimentares e ambientais. Possui, ainda, a vantagem da menor manipulação das amostras com menor possibilidade de contaminação e erro na execução. A alta sensibilidade, no entanto, da RT-PCR em tempo real detecta poucas cópias genômicas, podendo diagnosticar até mesmo indivíduos sem as manifestações clínicas da doença (Alkhouri & Danziger-Isakov 2011; CDC 2011).

## 1.7 - Imunidade, susceptibilidade e resistência

A maioria das informações sobre a imunidade e susceptibilidade/resistência advém de ensaios clínicos de infecção experimental em voluntários humanos (Lindesmith et al. 2005; Debbink et al. 2012).

No primeiro estudo realizado, voluntários desafiados com o protótipo Norwalk (NoV GI) apresentaram diarreia e vômito e, de uma forma geral, mostraram-se resistentes a uma nova infecção pela mesma variante viral até 6 a 14 semanas após o primeiro desafio. Contudo, quando esses mesmos voluntários foram desafiados com NoV heterotípicos, como Hawaii vírus, também ficaram doentes. De modo semelhante, os voluntários desafiados com o vírus Hawaii, que havia desenvolvido sintomas, foram susceptíveis aos NoV, revelando as características de uma resposta imune homotípica e de curta duração nas infecções por NoV (Wyatt et al. 1974).

Em outro ensaio, doze voluntários foram desafiados com NoV e estes desafios sequenciais mostraram dois padrões distintos de reposta à infecção: um padrão de susceptibilidade e outro de resistência. Seis voluntários desenvolveram doença gastrointestinal a partir do desafio inicial,

e esses novamente desenvolveram tal doença após um novo desafio 27 a 42 meses depois, sugerindo que não foi conferida uma imunidade de longa duração pela infecção. Em contraste, os outros seis indivíduos não ficaram doentes com o primeiro desafio e também foram resistentes a um novo desafio 31 a 34 meses depois (Parrino et al. 1977).

Para se avaliar os determinantes da resistência aos NoV de alguns voluntários adultos, Greenberg et al. (1981) analisaram o soro e os níveis de anticorpos a partir de fluido do jejuno em voluntários antes que esses recebessem o desafio de NoV. Não foi observada correlação entre esses níveis de anticorpos e a resistência à infecção por CV. Pelo contrário, os níveis de anticorpos no fluido jejunal de voluntários susceptíveis foram significantemente mais altos que os de voluntários resistentes. Uma interpretação dessas observações é que os níveis de anticorpos contra NoV são um indicador de exposição passada e consequente susceptibilidade, enquanto a ausência ou baixos níveis de anticorpos significam relativa resistência à infecção por NoV.

Embora os NoV sejam altamente infecciosos, estudos com voluntários mostraram que esses mantiveram-se não infectados, mesmo após serem desafiados com altas doses desses vírus, não ficando claro, portanto, se esses voluntários permaneceram sem sintomas devido a uma resistência genética à infecção, resistência inata ou por uma imunidade pré-existente aos NoV (Matsui & Greenberg 2000; Donaldson et al. 2010; Li et al. 2012). Há estudos, no entanto, com “virus-like particles” (VLPs) que relacionam a susceptibilidade/resistência à infecção por NoV com os antígenos do grupo sanguíneo humano (AGSH).

As VLPs são partículas comparáveis em tamanho, morfologia e propriedades antigênicas aos vírions de NoV, entretanto, por não possuírem genoma viral, não são infecciosas. Essas podem ser produzidas a partir de diversos sistemas de expressão como os baculovírus, células vegetais e de mamíferos, possibilitando um grande progresso nos estudos dos CV, podendo ser utilizadas em estudos de análise da interação entre o vírus e a célula hospedeira, bem como em estudos da resposta imunológica do hospedeiro à infecção e são fortes candidatas às vacinas contra estes agentes (Parra et al. 2012).

As VLPs ligam-se aos AGSH, os quais podem ser secretados na mucosa intestinal da maioria dos indivíduos, tornando-os susceptíveis à infecção por NoV, enquanto pessoas que não secretam estes antígenos na mucosa, são resistentes à esta infecção (Marionneau et al. 2002) . A relação entre a expressão destes antígenos e a susceptibilidade aos NoV vem sendo confirmada, em alguns estudos, utilizando os NoV GI e algumas variantes do GII, incluindo GII.4 (Larsson et al. 2006; Lindesmith et al. 2008; 2012). Acredita-se que os NoV infectam indivíduos que têm o gene que codifica para a enzima funcional alfa-1,2 fucosiltransferase (FUT2), sendo denominados indivíduos secretores positivos (Lindesmith et al. 2003). A FUT2 media a expressão do carboidrato H tipo-1, não só na superfície das células vermelhas do sangue, mas também na superfície das células epiteliais de mucosas, bem como sua secreção em fluidos corpóreos, como a saliva (Marionneau et al. 2001). Indivíduos que apresentam mutações na enzima FUT2 são não secretores e, portanto, não expressam os antígenos do grupo sanguíneo na mucosa intestinal, os quais são necessários para a ligação e consequente penetração dos CV nas células hospedeiras, sendo considerados, portanto, indivíduos resistentes à infecção (Thorven et al. 2005). Algumas mutações de inativação do gene FUT2, responsáveis pelo fenótipo não secretor já foram identificadas: mutação G428A nonsense, a qual representa mais de 95% das mutações de inativação encontradas na população da Europa e da África descendente; mutação atenuada A385T missense, encontrada em alta frequência nas populações asiáticas (Oriol et al. 2000). Aproximadamente 20% dos europeus são homozigotos recessivos para a mutação de inativação G428A e não produz o carboidrato H tipo-1 (Marionneau et al. 2002).

Apesar da realização dos diversos estudos, ainda não se compreende muito bem os mecanismos de resposta imune à infecção por NoV e, menos ainda se sabe sobre a imunidade aos SaV, porque a maioria dos estudos foram realizados com os genogrupos I e II dos NoV (Lindesmith et al. 2005; Matsui & Greenberg 2000). Além disso, os estudos com voluntários desafiados utilizavam inóculos com número muito maior de partículas virais do que a quantidade necessária para causar a doença, pois se estima que 18-20 partículas virais de NoV sejam suficientes para iniciar uma infecção

(Tenius et al. 2008). Dessa forma, a imunidade homotípica desenvolvida a partir de doses virais similares àquelas que ocorrem na comunidade, pode levar ao desenvolvimento de outro padrão de resposta imune, provavelmente, mais amplo e duradouro (variando de 4 a 8 anos), como mostrado em modelos matemáticos de transmissão de NoV na comunidade (Simmons et al. 2013).

## 1.8 - Epidemiologia

As gastroenterites representam uma das principais causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo e a segunda causa de morte em crianças menores de cinco anos de idade. A organização mundial de saúde estima que existam pelo menos 4,6 bilhões de episódios de doenças diarreicas, com aproximadamente 2,2 milhões de mortes associadas às gastroenterites a cada ano, sendo 1,5 milhão em crianças menores de cinco anos de idade (WHO 2009).

Os CV, principalmente os norovírus (NoV), são responsáveis pela maioria dos casos de gastroenterite epidêmica não bacteriana em diversos países do mundo como Estados Unidos, Holanda, Reino Unido e China, dentre outros (Dai et al. 2011; Tam et al. 2012; Verhoef et al. 2012; Bernard et al. 2013; Sai et. 2013; Vega et al. 2013). O "*Centers for Disease Control and Prevention*" (CDC) estima que, a cada ano, somente nos Estados Unidos, mais de 20 milhões de casos de gastroenterites agudas sejam causados por NoV (CDC 2011).

Os surtos por NoV não são incomuns, e têm sido reportados, principalmente em lugares semifechados e com aglomeração, como cruzeiros, restaurantes, asilos, escolas e creches (Koopmans et al. 2008; Vivancos et al. 2010; Danial et al. 2011; De Oliveira et al. 2013). Surtos em ambiente nosocomial são também comuns (Siebenga et al. 2008; Sukhrie et al. 2011).

No Brasil, estudos têm demonstrado índices de positividade para CV que variam de 9 a 67% (Ferreira et al. 2008; Xavier et al. 2009; Ferreira et al. 2012). Entretanto, deve-se observar que o tipo de população e os métodos de detecção para a caracterização molecular de NoV são muito variáveis.

Também no Rio de janeiro, entre os anos de 1994 a 2008, 538 amostras fecais provenientes de 23 surtos e também de casos esporádicos em crianças menores de cinco anos de idade de uma creche, foram testadas para a detecção de rotavírus, astrovírus e NoV, sendo os vírus detectados em 47,7% dos casos. As taxas de detecção foram de 16,1% para rotavírus, 6,3% para astrovírus e 33,4% para NoV. Assim, este estudo demonstrou o impacto das gastroenterites por NoV nestas crianças, superando até mesmo os casos de infecções por rotavírus, que são mais comumente associadas a gastroenterites em crianças dessa faixa etária (Ferreira et al., 2012).

Morillo et al. (2011) relataram que em São Paulo, no verão de 2010 foram reportados vários surtos de gastroenterite por NoV, detectados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo.

Em estudo realizado, no Centro-Oeste do Brasil, os CV foram detectados em 7,6% e 8,6% das amostras fecais de crianças menores de cinco anos de idade com gastroenterite aguda (Borges et al. 2006; Andreasi et al. 2008).

Com relação à variabilidade genômica dos NoV circulantes em todo o mundo, tem-se observado que certos genótipos dos NoV estão mais associados a rotas específicas de transmissão, por exemplo, as variantes de GII.4 estão mais comumente associadas à transmissão pessoa-pessoa, enquanto que algumas variantes do GI, a surtos associados ao consumo de água e alimentos contaminados (Siebenga et al. 2007; Matthews et al. 2012). Os NoV pertencentes aos genogrupos I e II são responsáveis pela maioria das infecções por NoV na comunidade (Matthews et al. 2012).

Há pelo menos duas décadas, tem sido observada a predominância de circulação de amostras pertencentes ao GII.4 que tem sido parcialmente explicada pelo fenômeno de mudança antigênica (“antigenic drift”), caracterizado por constantes mutações no genoma viral, que ocorrem principalmente na região codificante do capsídeo viral, resultando em evasão da imunidade (Lindesmith et al. 2008). Esta característica das amostras GII.4 resulta em rápida disseminação viral, ocasionando surtos no mundo todo (Siebenga et al. 2009).

No Rio de Janeiro, Brasil, crianças de uma creche no município de Resende, Rio de Janeiro, apresentaram casos espontâneos de

gastroenterite aguda. Além disso, municípios vizinhos também relataram surtos de gastroenterites. Foram obtidas amostras fecais de adultos e crianças envolvidos, sendo os norovírus detectados em 66% das amostras, as quais foram caracterizadas como GII.4 (Ferreira et al. 2008).

Recentemente, em Goiânia, foi realizado um monitoramento de crianças frequentadoras de uma creche, sendo observada excreção assintomática e prolongada, além de uma elevada variabilidade genética das amostras positivas para NoV e SaV (De Oliveira et al. 2013).

A infecção prolongada por CV tem sido observada entre os pacientes hospitalizados e/ou imunocomprometidos, como os que apresentam infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), os pacientes com câncer e/ou submetidos a transplante de órgãos sólidos e de células progenitoras hematopoiéticas, dentre outros tipos de transplante (Bok & Green 2012). Siebenga et. al. (2008) relataram que a infecção por NoV foi responsável por doença e excreção de forma prolongada nas fezes de pacientes hospitalizados. Roos-Weil et al. (2011) analisaram amostras de 20 pacientes com diarreia crônica que receberam transplante renal, dentre esses, 16 apresentaram infecção por NoV, que durou em média 8,7 meses. Schorn et al. (2010) também relataram infecção crônica por NoV, com persistente excreção viral e diarreia intermitente em pacientes que receberam transplante renal. Roddie at al. (2009) relataram infecção prolongada por NoV, em média três meses, em paciente que receberam TACPH. Outros estudos relatam diarreia crônica e infecção prolongada por CV em crianças, após essas receberem transplante intestinal, renal, e de medula óssea ou apresentando alguma outra forma de imunocomprometimento (Kim et al. 2011; Saif et al 2011; Chehade et al. 2012; Robles et al. 2012; Munir et al. 2013).

Os estudos citados mostram a ampla circulação dos CV que infectam indivíduos em diversas partes do mundo, fato esse que se deve, em grande parte, às características biológicas e à elevada variabilidade genômica e antigênica destes vírus.

## 1.9 - Prevenção, controle e tratamento

As medidas de saneamento básico e higiene pessoal contribuem para a diminuição dos casos de gastroenterites, principalmente, os relacionados à infecção bacteriana e parasitária. No entanto, essas práticas não são suficientes para prevenir a ocorrência das gastroenterites virais (Rockx et al. 2002). Dentre os agentes etiológicos das gastroenterites virais, destacam-se: os rotavírus (Chen et al. 2012), adenovírus entéricos (Shimizu et al. 2007), astrovírus (de Benedictis et al. 2011), calicivírus (norovírus e sapovírus) (Ushijima 2009; Chen & Chiu et al. 2012), dentre outros.

Não há métodos específicos voltados para a prevenção e o controle dos CV que infectam humanos, mas algumas medidas simples, como a higienização das mãos, por no mínimo 20 segundos, com água e sabão, reduz o número de micro-organismos por meio da remoção mecânica (Sickbert- Bennet et al. 2005). Em alguns estudos, a lavagem das mãos com água e sabão, por 20 segundos, mostrou- se mais eficaz na redução dos NoV que o álcool, o qual não demonstrou considerável redução do número de cópias genômicas pela análise por PCR em tempo-real (Liu et al. 2010).

Em casos de surtos, deve-se primeiramente investigar o modo de transmissão e a possível fonte de contaminação, alertar para as medidas de higiene das mãos, excluir funcionários doentes até 48- 72 horas após a resolução dos sintomas para interromper a transmissão viral. Em ambientes fechados ou instituições (hospitais, cruzeiros, asilos, escolas, orfanatos, acampamentos militares e similares) é recomendado o isolamento dos doentes por 24- 48 horas após a resolução dos sintomas. Depois da realização da limpeza para remover sujidades, realiza-se a desinfecção das superfícies do ambiente, utilizando solução à base de cloro de 1000- 5000 ppm (diluição de 1: 50- 1:10 da água sanitária pura) (CDC 2011). As contaminações alimentares que ocorrem durante o preparo dos alimentos, devem ser evitadas por meio da lavagem contínua das mãos. Os manipuladores de alimentos devem usar luvas plásticas para o preparo de alimentos crus (Thornton, et al 2004). Funcionários doentes não devem preparar alimentos por um período mínimo de três dias após o cessar dos sintomas, para evitar novos surtos de gastroenterite (Parashar et al. 2001).

Há estudos, no entanto, que relatam que mais de 30% das infecções por NoV são assintomáticas, e, neste caso, há excreção do vírus, mesmo que em menor quantidade se comparado às pessoas sintomáticas, o que propicia a disseminação viral e novos casos de surtos (Gallimore et al. 2004; Garcia et al. 2006; Phillips et al. 2009).

Como não há métodos eficazes para a prevenção e controle dos CV, o desenvolvimento de uma vacina vem sendo exaustivamente estudado para reduzir a incidência das gastroenterites virais. Inúmeros obstáculos, no entanto, como: a existência de múltiplos genótipos; imunidade contra os CV não muito bem compreendida; dificuldade no cultivo *in vitro* e estabelecimento de um modelo animal ideal para o estudo dos CV que infectam humanos tornam as pesquisas mais lentas e complexas (Cheetham et al. 2006, Souza et al. 2007; Sestak et al. 2012). Vacinas candidatas vêm sendo testadas para uso na prevenção da doença causada pelos CV que infectam humanos, baseadas nos estudos da ligação das VLPs aos AGSH, no entanto, não está ainda bem estabelecido que os CV realmente usem as mesmas propriedades de ligação aos carboidratos que as VLPs. Se realmente for comprovado que os CV que infectam humanos têm as mesmas propriedades de ligação, esses estudos poderão ajudar no desenvolvimento de vacinas, antivirais e terapias para reduzir a doença e a transmissão das infecções por CV (Hutson et al. 2004; Atmar et al. 2011; Lindesmith et al. 2012; Richardson et al. 2013).

Ainda não há um antiviral para o tratamento das gastroenterites por CV, o tratamento consiste basicamente na reidratação, usando-se fluido oral com líquidos isotônicos. A hospitalização em casos de desidratação grave, embora rara, pode ser necessária. Sintomas como cefaleia, mialgia e náusea podem ser combatidos com analgésicos e antitérmicos (Treanor & Dolin 2000).

Entretanto, o composto nitazoxanida tem sido proposto para o tratamento das gastroenterite virais, demonstrando maior eficácia contra os rotavírus quando comparado com os demais patógenos virais (Rossignol & El- Gohary 2006). Em paciente adulto submetido a transplante de medula óssea, com diagnóstico de DECH pulmonar e cutânea, além de gastroenterite por NoV, este medicamento foi capaz de resolver a diarreia

profusa, apesar da excreção assintomática durar mais de trinta dias, sendo portanto, uma alternativa terapêutica segura, uma vez que a redução da imunossupressão não era uma opção viável, devido à doença do enxerto contra hospedeiro (Siddiq et al. 2011).

## 1.10- Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas, doença do enxerto contra o hospedeiro e a infecção por calicivírus

O transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH) é usado primariamente no tratamento de doenças hematológicas malignas (leucemias e linfomas), mas também para desordens autoimunes e hereditárias, anemia de Fanconi, aplasia medular, anemia falciforme, erros inatos do metabolismo, entre outros casos (Edward & Copelan 2006). Os transplantes são classificados em três principais tipos: isogênicos/ singênicos, autólogos e alogênicos. Os transplantes isogênicos/ singênicos ocorrem entre indivíduos geneticamente idênticos (gêmeos monozigóticos); entre o mesmo indivíduo é denominado autólogo, ou seja, as células progenitoras utilizadas são do próprio paciente; em indivíduos da mesma espécie, porém, geneticamente diferentes, o transplante é denominado alogênico, que consiste na retirada da medula óssea de um doador previamente selecionado por testes de compatibilidade sanguínea (Azevedo & Ribeiro 2000).

O transplante alogênico consiste na infusão de células progenitoras hematopoiéticas de um doador aparentado ou não aparentado, originadas da medula óssea, sangue periférico ou sangue do cordão umbilical, utilizado para reconstituir o sistema hematopoiético doente ou danificado, do receptor, por quimioterapia e/ ou radioterapia. Há estudos que demonstram vantagens clínicas do emprego de células do sangue periférico se comparado às células da medula óssea para a realização do transplante, como: recuperação hematopoiética mais rápida, resultando em menor morbidade, redução do número de transfusões de plaquetas e glóbulos vermelhos e, menos causas de infecções. Além disso, as células-tronco do sangue periférico mobilizadas são tratadas com fatores de crescimento, que propiciam o aumento destas células circulantes em cem vezes ou mais. No

entanto, o uso das células-tronco do sangue periférico para o transplante está mais relacionado ao desenvolvimento de doença do enxerto contra hospedeiro crônica (DECHc) (Chang et al. 2012; Zhang et al. 2012). O transplante com células provenientes do cordão umbilical têm a capacidade de reconstituir o sistema hematopoiético, entretanto, apresenta um reduzido número de células progenitoras hematopoiéticas quando comparado ao transplante de células periféricas, sendo realizado somente em crianças ou em indivíduos com baixo peso corporal (Vigorito & De Souza 2009).

Em geral, o transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas (TACPH) resulta em uma maior imunossupressão do organismo do paciente, a fim de evitar a principal complicação decorrente deste tipo de transplante, que é o desenvolvimento da doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), caracterizada pela reação dos linfócitos T do doador aos tecidos do receptor, resultando em doença primariamente na pele, fígado e trato gastrointestinal. No primeiro trimestre, essa complicação é denominada aguda, após este período, crônica. A DECH geralmente ocorre devido à incompatibilidade imunogenética entre o doador e receptor, infusão de linfócitos T imunocompetentes do enxerto no receptor e incapacidade do receptor de rejeitar as células T do doador (Paton et al. 2000). Para a profilaxia da DECH são comuns: o uso combinado de ciclosporina e metotrexato, corticoides, tacrolimus e micofenalato mofetil, que têm função imunossupressora (Balman et al. 2009).

A DECH intestinal aguda (DECHa) usualmente inclui manifestações clínicas caracterizadas por náusea e diarreia líquida profusa, sendo o vômito um sintoma menos comum. Dores abdominais severas, diarreia sanguinolenta e a perda de grande quantidade de fluidos caracterizam o avanço desta doença (Balman et al. 2009).

As infecções fúngicas, bacterianas, virais e parasitárias, podem ocorrer depois do transplante, mesmo em pacientes que não desenvolvem a DECH, devido ao estado de imunocomprometimento do paciente, como resultado da quimioterapia e terapia imunossupressora. Dentre essas, as mais comuns são as de origem gastrointestinal. As gastroenterites podem ser causadas principalmente por bactérias, protozoários e vírus. Adenovírus, rotavírus têm sido relatados como importantes agentes etiológicos virais

causadores de gastroenterite em pacientes imunocomprometidos (Liakopoulou et al. 2005; Danziger-Isakov 2013; Rynans 2013). No entanto, os CV, principalmente os NoV, vêm recentemente ganhando grande destaque por estarem associados à significativa causa de morbidade e mortalidade neste grupo de pacientes, incluindo aqueles submetidos a transplante de células tronco e órgãos sólidos (Doshi et al. 2013; Robles et al. 2012; Saif et al. 2011; Schwartz et al 2011; Ebdrup et al. 2010; Schorn et al. 2010; Roddie et al. 2009). Acredita-se que, dentre as complicações causadas pela infecção por NoV estão os danos à mucosa, aumentando a vulnerabilidade destes pacientes à infecção por bactérias intestinais (Castagnola et al. 2008; Nelson et al. 2012).

## 2 - JUSTIFICATIVA

Pacientes imunocomprometidos, como os pacientes que receberam TACPH são submetidos a diversos procedimentos que resultam em um estado grave e prolongado de imunocomprometimento: radioterapia e quimioterapia para o tratamento da doença e como etapa preparatória para o enxerto e, logo depois do transplante, continuam sendo tratados com diversos medicamentos imunossupressores, a fim de que não haja uma resposta das células do paciente receptor contra as do doador. Essa imunossupressão melhora a sobrevida do enxerto, entretanto, deixa os pacientes suscetíveis a diversas complicações infecciosas (Danziger-Isakov 2013).

Nos pacientes submetidos a TACPH, diarreia líquida e náuseas, são sintomas comuns e muitas vezes relacionadas à DECHa intestinal, sintomas esses que também caracterizam a infecção por CV. Portanto é de extrema importância diferenciar a causa dos referidos sintomas, pois o tratamento realizado para a DECHa consiste em uma maior imunossupressão do paciente, o que pode resultar em piora do quadro clínico nos casos de infecção por CV (Roddie et al. 2009; Schwartz et al. 2011).

Ademais, apesar de estudos recentes terem destacado a ocorrência de CV, principalmente NoV, em pacientes submetidos a TACPH (Robles et al. 2012; Doshi et al. 2013) não foi ainda realizado nenhum estudo prospectivo de monitoramento à longo prazo da infecção por CV nesta população.

Diante do exposto, é de suma importância a condução de um estudo na intenção de se observar a ocorrência da infecção por NoV/SaV em pacientes pós-transplantados, os fatores associados à infecção por estes agentes nesta população, bem com determinar as características moleculares destes vírus. Estas informações são de relevância para que o diagnóstico da infecção por CV seja incluído na rotina de exames, tanto durante o preparo para o transplante, quanto após, na fase de acompanhamento clínico e laboratorial da referida população de estudo.

# 3 - OBJETIVOS

## 3.1- Geral

- Monitorar pacientes submetidos ao TACPH para a infecção por NoV/SaV.

## 3.2- Específicos

- Pesquisar NoV/SaV em amostras de soro e fezes obtidas de pacientes submetidos ao TACPH;
- Avaliar o tempo de excreção viral e duração do RNA viral no soro dos pacientes;
- Realizar a caracterização molecular das amostras positivas para NoV/SaV;
- Avaliar a associação entre a positividade para NoV/SaV e: grupo sanguíneo e/ou fenótipo secretor dos pacientes, presença de determinados sinais e sintomas clínicos apresentados e piora do prognóstico dos pacientes

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo prospectivo descritivo de monitoramento da infecção por NoV/SaV, realizado pelo período de um ano em pacientes que foram submetidos a transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas (TACPH).

As amostras clínicas dos pacientes foram coletadas somente após o preenchimento e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 1). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG (protocolo 429/11) (Anexo 1) e do Hospital Araújo Jorge (Anexo 2).

Foi utilizado como critério de inclusão o tipo de transplante: alogênico e aparentado. Como critério de exclusão foi definido o transplante ser do tipo autólogo.

*Questionário:*

A partir da ficha de investigação clínica (Apêndice 2), preenchida por médicos e enfermeiros responsáveis, foram obtidas informações sobre os principais sintomas e sinais clínicos apresentados pelos pacientes durante o período de estudo.

*Revisão de prontuários médicos:*

Os prontuários médicos foram revisados, para a obtenção de informações clínicas e dados laboratoriais utilizados neste estudo.

*Descrição da Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital Araújo Jorge*

A Unidade de Transplante de Medula Óssea (UTMO) do Hospital Araújo Jorge/Associação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ/ACCGO) foi criada em 2000 e é o primeiro e único serviço credenciado pelo Ministério da Saúde para este tipo de procedimento em todo Centro-Oeste e Distrito Federal pelo Sistema Único de Saúde. Nos últimos três anos, a UTMO/HAJ/ACCGO realizou uma média anual de 14 TACPH e 29 transplantes autólogos de células progenitoras hematopoiéticas. A unidade

possui quatro leitos para o atendimento de transplantados, quartos: 217, 218, 219 e 220, interligados por um corredor em comum. Existe uma antessala, a qual contém uma pia destinada à lavagem das mãos, armários contendo os capotes limpos e estéreis e uma bancada, na qual se encontra os prontuários dos pacientes que estão na unidade de transplante e as prescrições médicas de cada um deles. Uma porta separa a antessala do corredor, o qual tem entrada para os quartos dos pacientes. No corredor da unidade encontram-se armários com gavetas, onde se localizam os medicamentos e materiais necessários para o atendimento dos pacientes. Todos quartos são equipados com filtro HEPA *(High Efficiency Particulate Air)*, que garante a filtragem do ar. Além disso, cada quarto dispõe de banheiro e pias individuais, como medida de prevenção de contaminações entre pacientes.

Todos os funcionários da unidade usam máscara, luva e jaleco. Os pacientes não podem circular no corredor da unidade de transplante, no entanto, os acompanhantes entram e saem do corredor, para buscar alguns pertences dos pacientes que eles estão acompanhando, para a realização das refeições, no refeitório próprio para isso, as quais são oferecidas pelo próprio hospital, e para usar o banheiro. Antes de entrar no corredor da unidade, os acompanhantes lavam as mãos na pia da antessala e vestem capote. A alimentação dos pacientes é realizada no quarto em que cada um se encontra, não sendo permitida a entrada de nenhum alimento trazido de fora do hospital e os pacientes só podem consumir água mineral, disponibilizada também pelo hospital.

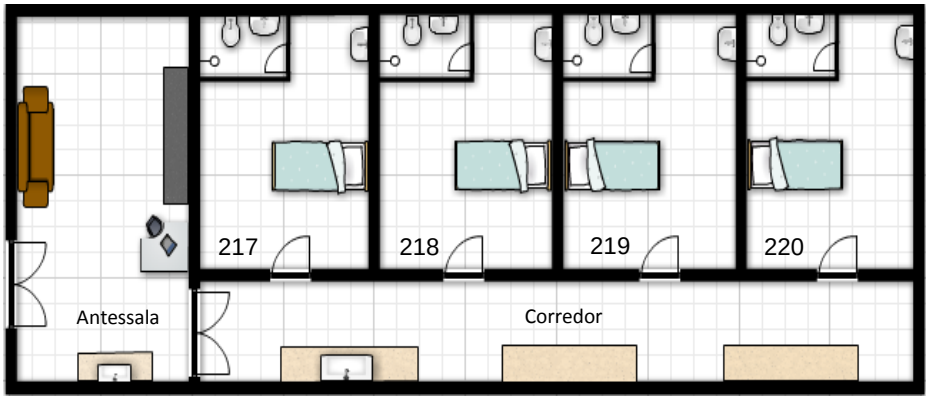


**Figura 3.** Representação esquemática da organização espacial da Unidade de Transplante de Medula Óssea do HAJ/ACCGO.

## 4.1- População de estudo

Foram incluídos, neste estudo, dez pacientes da UTMO do Hospital Araújo Jorge- Associação de Combate ao Câncer de Goiás (AAC-GO), que foram submetidos ao TACPH, no período de outubro de 2012 a julho de 2013.

## 4.2- Material de estudo

Foram coletadas amostras de saliva, soro e fezes de todos os pacientes participantes do estudo. Apenas uma amostra de saliva foi coletada, de cada paciente, para determinação do genótipo/fenótipo secretor**.** Amostras de soro e fezes foram coletadas antes e após a realização do transplante. As amostras de fezes foram coletadas semanalmente, e com maior frequência, diariamente ou, a cada dois dias, no advento da gastroenterite, e as de soro a cada duas semanas até a alta médica.

Após alta dos pacientes, esses retornavam às consultas ambulatoriais e, portanto, os espécimes clínicos eram coletados nos dias das consultas médicas de rotina. Pesquisas, nas fezes, de outros agentes patogênicos, como os agentes bacterianos: *Clostridium difficile, Salmonella, Shigella, Campylobacter sp, Escherichia coli;* agentes virais como: adenovírus, astrovírus e rotavírus; e agentes parasitários, não foram realizadas. Amostras de sangue para a realização de cultura de aeróbios e fungos são colhidas somente no advento de febre e/ou sinais de infecção.

## 4.3- Metodologia

### 4.3.1- Processamento das amostras coletadas

As amostras de sangue foram coletadas em tubos secos a vácuo e incubadas à temperatura ambiente até completa coagulação com posterior centrifugação a 3.000 rpm por cinco minutos para a obtenção do soro. As amostras de soro foram então aliquotadas (duas alíquotas por amostra) em frascos apropriados e armazenadas a -20°C e a -70°C até o momento do uso.

As amostras de fezes foram coletadas em frascos coletores estéreis e estocadas a 4°C até serem transportadas (em no máximo duas horas) para o laboratório de Virologia/IPTSP/UFG, onde eram processadas para a obtenção de uma suspensão fecal a 20% em tampão salina fosfato (PBS) pH 7,4. As suspensões homogeneizadas e clarificadas por centrifugação a 2000 rpm por sete minutos, e os sobrenadantes recolhidos e estocados a -20°C e a -70°C até o momento de uso.

### 4.3.2- Determinação do grupo sanguíneo e do fenótipo secretor

A determinação do grupo sanguíneo dos pacientes foi realizada pelo serviço de hemoterapia do Hospital Araújo Jorge e as informações foram obtidas através de prontuário médico.

A determinação do fenótipo secretor foi realizada através de EIE, utilizando a lectina-UEA (Ulex europaeus agglutinin), que se liga de forma específica ao antígeno H-1, expresso nas mucosas e saliva, somente de indivíduos secretores, seguindo protocolo descrito por Nordgren et al. (2013), com modificações. De modo breve, os micropoços de uma placa de poliestireno (Nunc Maxisorb) foram sensibilizadas com 100 µl de saliva dos pacientes e uma amostra de saliva controle positivo (saliva de um indivíduo conhecidamente com fenótipo secretor), previamente diluídas a 1:250 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 6,8) e foi feito o bloqueio, por uma hora, com solução a 3% de albumina bovina em PBS (pH 6,8). Em seguida, adicionou-se 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 dez minutos de incubação, pela adição de 100 µl da solução de parada (ácido sulfúrico a 1N), seguida de leitura visual, sendo a intensidade da coloração diretamente proporcional à concentração de antígeno presente nas amostras.

### 4.3.3- Detecção e caracterização molecular de NoV e SaV

#### *4.3.3.1- Extração do RNA viral*

A extração de RNA viral foi realizada a partir das suspensões fecais e do soro, utilizando-se o método de Boom et al. (1990), com modificações (Cardoso et al., 2002) e o QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen), respectivamente. Para extração do RNA de calicivírus das amostras fecais, foram utilizados 300µL da suspensão fecal acrescidos de 800µL de tampão L6 (Isotiocianato de guanidina, Tris/HCl, EDTA e Triton) e 20µL de Proteinase K . Após incubação a 56ºC por 10 minutos, foram adicionados 200µL de etanol absoluto e 15µL 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 absoluta, seguindo-se uma nova incubação a 56ºC por 10 minutos, acréscimo de 30µL de água Milli-Q/DEPC, a mesma incubação novamente, centrifugação por três minutos e após este processo, 20µL do sobrenadante era recolhido e submetido à transcrição para obtenção do cDNA viral.

#### *4.3.3.2- Pesquisa de NoV/SaV em amostras de soro e fezes*

Para a pesquisa de ácido nucléico de NoV/SaV, a partir dos soros e amostras fecais dos pacientes, foi utilizada a metodologia de 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 (80ºC/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 42ºC por 60 minutos no termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal).

Para a amplificação, iniciadores específicos para segmentos de regiões codificantes para o capsídeo viral dos NoV do genogrupo I e II (Kojima et al. 2002; Yan et al. 2003) e SaVs (Yan et al. 2003) foram utilizados simultaneamente na reação, por meio de uma PCR multiplex. A reação foi constituída de 10µL do cDNA acrescido de 15µL 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 / 1µM de cada iniciador). A amplificação das amostras foi realizada utilizando a seguinte ciclagem: um ciclo de 94°C/3 min, 35 ciclos de 4ºC/30s; 55ºC/30s; 72ºC/60s e um ciclo de extensão final 72ºC/7min.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5% através de transiluminador de luz UV (Hoeffer), usando como padrão de peso molecular o 100pb DNA *ladder* (Invitrogen). O tamanho esperado dos amplicons era de 330pb para NoV GI, 344pb para NoV GII e 434pb para SaV. Para todas as amostras positivas, foi realizado a PCR monoplex utilizando-se os pares de iniciadores em separado, de acordo com o tamanho da banda visualizada na reação de PCR multiplex, para confirmação dos resultados.

As amostras de cada paciente foram processadas e testadas em separado. As amostras negativas em uma primeira RT-PCR eram processadas novamente, através da preparação de uma nova suspensão, com amostras diluídas 1:2 em tampão PBS para a realização de uma nova extração e repetição do RT-PCR para confirmação dos resultados.

### 4.3.4- Sequenciamento genômico e análise filogenética das amostras positivas para NoV

As amostras positivas para CV foram purificadas a partir dos produtos resultantes da RT-PCR monoplex, utilizando-se isopropanol a 65% e etanol a 70% de acordo com Green & Sambrook (2012): foi adicionado dois volumes de isopropanol a 65% no produto obtido, centrifugação por quinze minutos a 12.000 rpm/10°C, logo após, o sobrenadante foi desprezado e o tubo foi invertido em papel toalha, adicionou-se mais dois volumes de etanol a 70% e centrifugação por quinze minutos/12.000 rpm/10°C, o sobrenadante foi desprezado novamente e os tubos foram invertidos em papel toalha durante uma hora ou até ficarem completamente secos e, após esta etapa, foi adicionado 15 microlitros de água milliQ. Em seguida as amostras foram submetidas ao sequenciamento, utilizando as mesmas condições e pares de iniciadores da reação de RT-PCR, em sequenciador automático (DNA ABI

PRISM 3130, Applied Biosystems), e o sistema de reação de sequenciamento “Big Dye Terminator Cycle Sequencing” (Applied Biosystems, Foster City, CA). As sequências obtidas, neste estudo, foram alinhadas e comparadas com sequências de referência depositadas no *National Center for Biotechnology Information Database* (NCBID) (www.ncbi.nlm.nih.gov/genebank/index.html), utilizando-se o programa Clustal X2 (Thompson et al. 1997), A construção da árvore filogenética foi feita utilizando-se o software Mega 5.0 pelo método neighbor-joining (Tamura et al. 2011). Foram consideradas 1000 replicatas e valores de boostraps acima de 80%.

# 5- RESULTADOS

## 5.1- Características gerais da população estudada

As características gerais da população estudada estão representadas na Tabela 1.

Dos dez pacientes participantes do estudo, quatro eram do sexo masculino (40%) e seis do sexo feminino (60%); a idade dos pacientes variou de 21 a 55 anos, com uma média de 37,2 anos.

Quanto à doença primária, a maioria dos pacientes (60%) apresentava leucemia mielóide, aguda ou crônica, sedo que para a realização do transplante foram utilizadas células progenitoras da medula óssea (60%) ou do sangue periférico (40%) de doadores aparentados (irmãos ou irmãs dos pacientes). Em 90% dos casos, foi utilizado bussulfano para o condicionamento quimioterápico dos pacientes.

Todos os dez pacientes receberam profilaxia para doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), que consistiu na associação de ciclosporina com metotrexato, e profilaxia antimicrobiana. Quatro pacientes tiveram reativação do citomegalovírus e o tratamento foi realizado com ganciclovir, sendo que o mesmo tratamento foi prescrito aos pacientes 1 e 6, que, por falta de condições financeiras, não realizaram o exame laboratorial a fim de avaliar a reativação deste vírus. Apenas o paciente 6 apresentou, após o transplante, hemocultura e bacterioscopia positivas para cocos gram positivos, em razão de infecção no local da inserção do cateter.

Quanto ao fenótipo secretor dos participantes, dos dez pacientes, nove foram caracterizados como secretores (Se+) e somente um como não secretor (Se-).

**Tabela 1.** Características gerais referentes aos pacientes submetidos ao TACPH

| Pacientes | Sexo/Idade (anos) | Tipo sanguíneo | Doença primária | Células transplantadas | Quimioterapia | Profilaxia DECH | Profilaxia antimicrobiana | Reativação de CMV | Hemocultura | Óbito |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | M/55 | B+ | LMC | MO | BSO/FDA | CSA+MTX | T, F, AC, AL | TNR | Negativa | Não |
| 2 | F/43 | O+ | LMA | SP | BSO/ FDA | CSA+MTX | T, F, AC, AL | Sim | Negativa | Não |
| 3 | F/33 | O+ | AM | MO | BSO/ CFA | CSA+MTX | T, F, AC, AL | Não | Negativa | Sim |
| 4 | F/35 | A+ | LMA | SP | BSO/FDA | CSA+MTX | T, F, AC, AL | Sim | Negativa | Não |
| 5 | F/52 | A- | LMA | MO | BSO/FDA | CSA+MTX | T, F, AC, AL | Não | Negativa | Não |
| 6 | M/24 | O+ | LMA | MO | BSO/ CFA | CSA+MTX | T, F, AC, AL | TNR | Cocos G+ | Não |
| 7 | M/37 | A+ | LLA | SP | BSO/ FDA | CSA+MTX | T, F, AC, AL | Não | Negativa | Sim |
| 8 | M/21 | A+ | LLA | SP | BSO/ CFA/EPE | CSA+MTX | T, F, AC, AL | Sim | Negativa | Não |
| 9 | F/46 | O+ | LMA | MO | BSO/ FDA | CSA+MTX | T, F, AC, AL | Sim | Negativa | Sim |
| 10 | F/26 | A+ | AF | MO | CFA | CSA+MTX | T, F, AC, AL | Não | Negativa | Não |

Nota. M- sexo masculino; F- sexo feminino; LLC- leucemia linfóide crônica; LMA- leucemia mielóide aguda; LLA- leucemia linfóide aguda; AM- aplasia medular; F- anemia de Fanconi; MO- medula óssea; SP- sangue periférico; BSO- bussulfano; FDA- fludarabina; CFA- ciclofosfamida; EPE- etoposide; CSA- ciclosporina; MTX- metotrexato; T- trimetoprima sulfametoxazol; F- fluconazol; AC- aciclovir; AL- albendazol; CMV- citomegalovírus; TNR- teste não realizado; G+= Gram-positivos.

**Tabela 2.** Dados relacionados ao TACPH, à positividade para NoV e à DECH

| Pacientes | Quarto | Admissão na UTMO | Transplante | Alta da UTMO | Infecção por NoV | Primeira amostra de fezes positiva para NoV | Última amostra de fezes positiva para NoV | Primeira amostra de soro positiva para NoV | Última amostra de soro positiva para NoV | Sintomas | DECHa | DECHc |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 220 | 23/09/12 | 16/10/12 | 03/11/12 | Sim | 26/10/12 | 18/03/13 | 22/10/13 | 26/11/13 | D, F, V | Não | B,F |
| 2 | 220 | 20/11/12 | 27/11/12 | 11/12/12 | Sim | 26/11/12 | 24/01/13 | 11/01/13 | 14/02/13 | M, D, F, V | P,F,I | P,B,F |
| 3 | 218 | 23/01/13 | 01/02/13 | 12/02/13 | Sim | 22/02/13 | 15/04/13 | 04/03/13 | 02/04/13 | M, D, F, V | I | Não |
| 4 | 220 | 19/02/13 | 28/02/13 | 15/03/13 | Sim | 19/03/13 | 07/05/13 | 03/04/13 | 07/05/13 | M, D, F, V | Não | F |
| 5 | 217 | 27/02/13 | 07/03/13 | 26/03/13 | Não | - | - | - | - | M, D, F, V | Não | Não |
| 6 | 218 | 02/04/13 | 10/04/13 | 03/05/13 | Sim | 04/04/13 | 09/04/13 | ND | ND | M, D, F, V | I | Não |
| 7 | 219 | 30/04/13 | 07/05/13 | 27/05/13 | Sim | ND | ND | 21/05/13 | 26/06/13 | D, F, V | Não | Não |
| 8 | 220 | 14/06/13 | 26/06/13 | 29/07/13 | Não | - | - | - | - | M, D, F, V | P | Não |
| 9 | 217 | 20/06/13 | 27/06/13 | 13/07/13 | Não | - | - | - | - | M, F, V | P,F | Não |
| 10 | 217 | 18/07/13 | 24/07/13 | 13/08/13 | Não | - | - | - | - | M, F, V | Não | Não |

Nota. ND- não detectado; NoV- norovírus; M- mucosite; D- diarreia; F- febre; V- vômito; DECH- doença do enxerto contra hospedeiro; a- aguda; c- crônica; P- pele; F- fígado; I- intestino; B- boca.

## 5.2- Principais sintomas e intercorrências sofridos pelos pacientes infectados por NoV

Dados sobre o quarto de internação, data da admissão dos pacientes na UTMO, data do transplante, positividade para NoV, sintomatologia e intercorrências apresentadas pelos pacientes estão representados na tabela 2. Os sintomas clínicos mais comumente apresentados pelos pacientes foram: mucosite (80%), constipação (60%), diarreia (80%), febre e vômito (100%). Foram coletadas, ao total, 75 amostras de soro e 80 amostras de fezes, a média de amostras, por paciente, de fezes e soro, variou de três a 12 (média = 7,5) e de duas a 13 (média= 7,5), respectivamente.

Dos dez pacientes participantes do estudo, seis (60%) apresentaram amostras positivas para NoV, dos quais quatro em amostras de fezes e de soro, um apenas em amostras de fezes e outro, apenas em amostras de soro. Não sendo, entretanto, observada positividade para SaV.

Com relação à sintomatologia e positividade para os NoV, observou-se que diarreia, vômito e febre foram as manifestações clínicas mais comumente apresentadas, sendo que dos oito pacientes que apresentaram diarreia, seis (75%) tiveram amostras positivas para NoV.

O paciente 1 apresentou vômito e diarreia, no dia 23 de outubro, quando ainda estava internado na UTMO, no quarto 220. A primeira amostra de fezes coletada deste paciente, do dia 19/10/12, apresentou resultado negativo para CV, entretanto, as amostras obtidas posteriormente (do dia 26/10/12 a 18/03/13), foram positivas para NoV.

A paciente 2 apresentou náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia a partir do dia 28/11/12, quando ainda estava internada na Unidade de Transplante de Medula Óssea (UTMO), no quarto 220. A primeira amostra coletada por essa paciente, do dia 26/11/12, foi positiva para NoV, sendo que todas as amostras obtidas posteriormente, até o dia 24/01/13, foram positivas para NoV.

Para a paciente 3, foi possível obter amostra de fezes, somente dez dias após a mesma receber alta hospitalar da UTMO. Portanto, a coleta de amostras teve início dia 22/02/13, sendo esta amostra e todas as subsequentes, obtidas até o dia 15/04/13, positivas para NoV. No entanto, a

paciente 3, de acordo com os prontuários, começou a apresentar diarreia a partir do dia 03 de fevereiro de 2013, quando ainda estava internada na UTMO, no quarto 218.

A paciente 4 apresentou náuseas e vômitos, no período de internação na UTMO, e a primeira amostra positiva da paciente foi detectada quatro dias após receber alta da unidade, do dia 19/03/13. As amostras posteriores permaneceram positivas até o dia 07/05/13.

Foram observados, para a paciente 6, alguns episódios de vômitos e diarreia no início do mês de abril, período em que foram coletadas duas amostras fecais positivas para NoV, do dia 04/04/13 ao dia 09/04/13, quando ainda estava internado na UTMO, no quarto 218.

O paciente 7 apresentou náuseas, vômitos e diarreia a partir do dia 14/05/13, enquanto estava na UTMO, no quarto 219. No entanto, foram coletadas apenas três amostras de fezes, que foram negativas para NoV, sendo detectado NoV apenas nas amostras de soro deste paciente, do dia 21/0513 a 26/06/13. A amostra de soro positiva para NoV, obtida no dia 21/05/13, foi coletada no período em que o paciente ainda estava internado.

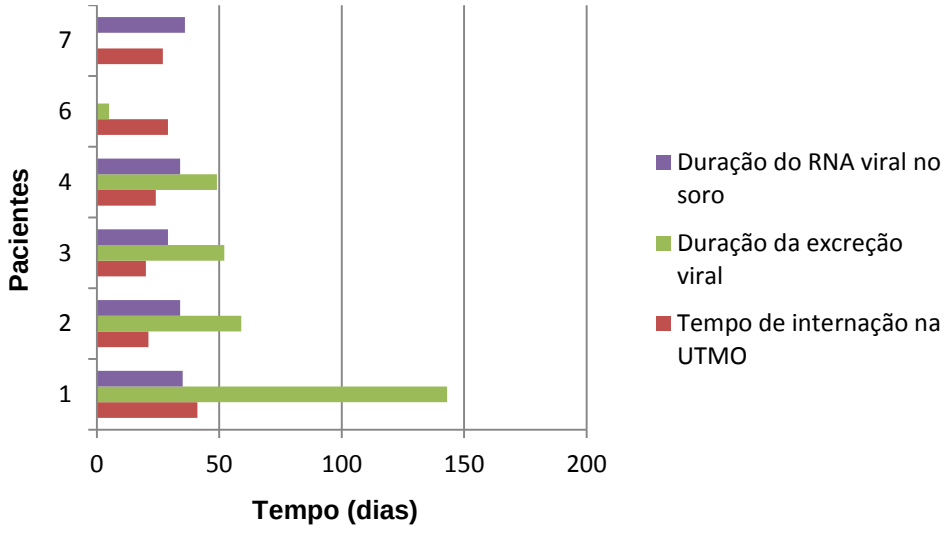


**Gráfico 1.** Duração da detecção de RNA viral no soro e nas fezes e tempo de internação dos pacientes submetidos ao TACPH na UTMO.

Quando analisamos as características da infecção por NoV nos pacientes submetidos a TACPH, é possível observar que o tempo de excreção viral nas fezes variou de cinco dias a 143 dias, com um tempo médio de 61,6 dias, e a duração de RNA viral no soro variou de 29 dias a 36 dias, com uma média de 33,6 dias (Gráfico 1). Quanto à associação entre data da internação dos pacientes na UTMO, data do transplante e início e fim da excreção de NoV. Observa-se que três pacientes (1, 3, e 4) tiveram a primeira amostra positiva para NoV, pelo menos dez dias após serem submetidos ao TACPH. Para os pacientes 2 e 6, foi observada positividade nas fezes, um e seis dias antes do transplante, respectivamente.

Deve ser destacado que o paciente 1 foi o primeiro a ser diagnosticado com infecção por NoV, sendo também o paciente que apresentou excreção viral mais prolongada (Gráfico 2).

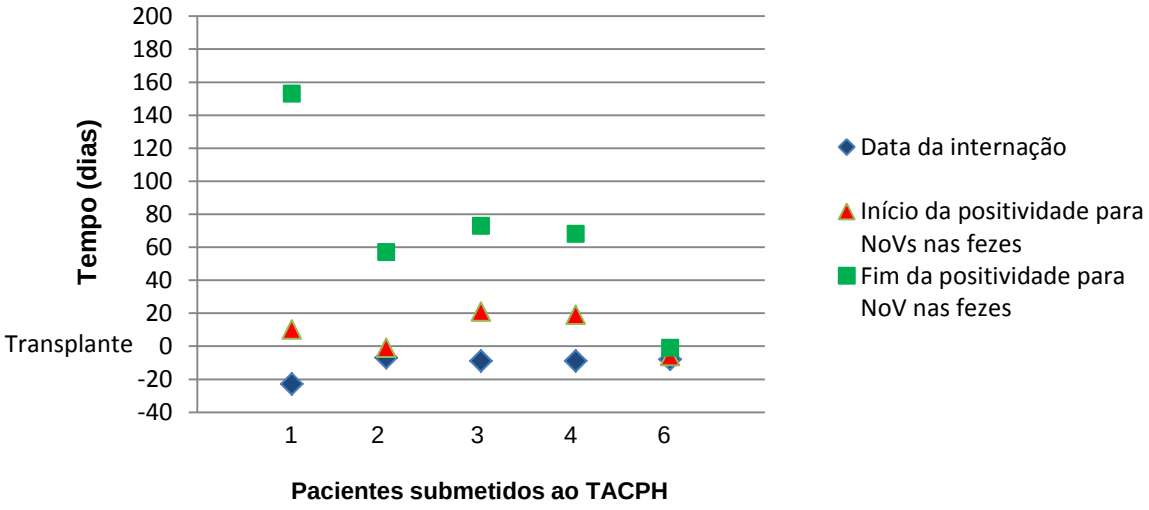


**Gráfico 2.** Ordem cronológica da positividade para NoV, nos seis pacientes submetidos ao TACPH.

Quando se avalia a presença ou ausência de DECH e infecção por NoV, observa-se que cinco (50%) tiveram DECHa, caracterizada por diagnóstico clínico. Desses, três (pacientes 2, 3 e 6) eram positivos para NoV. No paciente 2 a DECHa foi caracterizada como sendo de pele, fígado e intestino; nos pacientes 3 e 6, como intestinal; no paciente 8, como de pele;

e no paciente 9, como de pele e fígado. Nos pacientes, com DECHa intestinal, foi observada diarreia profusa, sendo instituído, após o diagnóstico, aumento da dose do imunossupressor ciclosporina. Para os pacientes 2 e 3, o diagnóstico de DECHa foi feito durante o quadro de infecção por NoV, já o paciente 6, apresentou DECHa intestinal após a resolução da infecção por NoV (Tabela 2).

As pacientes 2 e 4, que apresentaram infecção por NoV, tiveram reativação do citomegalovírus. Na paciente 2, a reativação do citomegalovírus ocorreu após a resolução da infecção por NoV, já na paciente 4, as infecções por NoV e citomegalovírus ocorreram concomitantemente (Tabelas 1 e 2).

### 5.3- Sequenciamento Genômico e Análise Filogenética das amostras positivas para NoV

Todas as amostras positivas para NoV, as de fezes e de soro, foram submetidas ao sequenciamento genômico e caracterizadas como pertencentes ao genótipo GI.3. Foi observada elevada identidade nucleotídica (99%) entre as amostras obtidas de paciente diferentes, bem como entre as amostras obtidas de um mesmo paciente (soro e fezes). Sendo assim, foram designadas como um único haplótipo (HP.HSCT.GO) (Figura 4). Este haplótipo foi agrupado com amostras GI.3 detectadas durante um surto de NoV por consumo de água contaminada na Suíça (Nenonem et al. 2012), bem como, com uma amostra proveniente de crianças quilombolas do Espírito-Santo, Brasil (Vicentini et al. 2013).

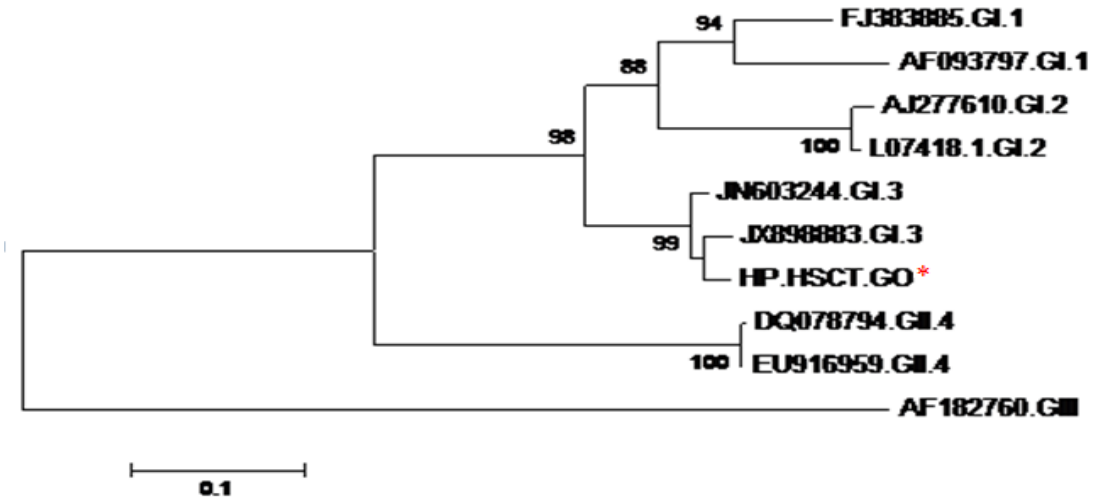


**Figura 4.** Análise filogenética de uma sequência parcial (330pb) do capsídeo dos norovírus (região C) detectados em amostras de pacientes submetidos ao TACPH. As amostras encontradas, neste estudo, estão representadas pelo haplótipo HP.HSCT.GO.

## 6- DISCUSSÃO

A infecção por NoV vem recebendo grande destaque entre pacientes imunocomprometidos (Bok & Green 2012), como os que são submetidos a TACPH, os quais podem apresentar diarreia e excreção viral prolongadas (Roddie et al. 2009; Saif et al. 2011; Robles et al. 2012; Doshi et al. 2013). Neste contexto, foi realizado um estudo prospectivo descritivo com o intuito de avaliar a ocorrência de CV (NoV e SaV) em pacientes submetidos a TACPH.

Foram incluídos no estudo, dez pacientes adultos, que tinha em média 37,2 anos de idade, distribuídos de modo homogêneo quanto ao gênero (feminino e masculino). Estes pacientes realizaram transplante alogênico aparentado, em decorrência, principalmente de leucemia (80%). As leucemias apresentam pior prognóstico clínico, se comparadas a outras desordens hematológicas, sendo necessária a realização do TACPH (CIBMTR 2013), o que explica o maior número de pacientes, neste estudo, com este tipo de neoplasia.

A maioria dos transplantes realizados teve como origem células de medula óssea, sendo que a origem das células transplantadas foi definida pelo médico, de acordo com a gravidade do quadro clínico apresentado pelo paciente. Nos casos mais graves foi realizado o transplante com células originadas do sangue periférico, e nos menos graves, o transplante com células da medula óssea. Há estudos demonstrando uma recuperação hematopoiética mais rápida em pacientes que recebem transplante com células do sangue periférico, entretanto, tem sido constatado que o transplante com células provenientes da medula óssea, se comparado ao que utiliza células periféricas, apresentam menos possibilidade de desenvolvimento de DECH aguda e crônica pelo paciente (Chang et al. 2012; Zhang et al. 2012).

O quimioterápico de escolha para os participantes do estudo foi o bussulfano, podendo estar associado à fludarabina, ciclofosfamida e etoposide. Apenas para uma paciente foi utilizada somente a ciclofosfamida, porque essa apresentou diagnóstico para anemia de Fanconi. Pacientes com diagnóstico de leucemia e aplasia medular geralmente são submetidos

à quimioterapia com bussulfano, associado a outro quimioterápico, como ciclofosfamida ou fludarabina, de acordo com os protocolos de condicionamento quimioterápico (CIBMTR 2013).

Todos os pacientes positivos para NoV foram caracterizados como Se+. Apesar de estudos com voluntários humanos revelarem uma maior susceptibilidade de indivíduos Se+ à infecção por NoV GI, outros têm demonstrado padrões variáveis de ligação de VLPs de NoV GI e GII a AGSH (Lindesmith 2003; Thorven et al. 2005).

Como referido, uma das intercorrências mais comumente associadas ao TACPH é a DECH e, portanto, na maioria dos casos, é instituída também a profilaxia para esta doença. Os fármacos administrados aos pacientes, deste estudo, foram ciclosporina e metotrexato, cuja função é induzir um estado de maior imunossupressão no organismo dos pacientes, a fim de se evitar a reação dos linfócitos T do doador aos tecidos do receptor e consequente desenvolvimento de doença primariamente na pele, fígado e trato gastrointestinal (Balman et al. 2009).

O tratamento profilático para infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias, consistiu nas administrações conjuntas de antibacterianos (trimetoprima sulfametoxazol), antifúngico (fluconazol), antiviral (aciclovir) e antiparasitário (albendazol). Apenas o paciente 6 apresentou, após o transplante, hemocultura e bacterioscopia positivas para cocos gram positivos, em razão de infecção no local da inserção do cateter.

O presente estudo identificou a ocorrência de NoV em seis pacientes, correspondendo a um índice de positividade de 60%. Dados da literatura revelam que os índices de positividade para NoV na população de transplantados variam de 16 a 75% (Roos-Weil et al. 2011; Saif et al. 2011; Schorn et al. 2010; Robles et al. 2012; Doshi et al. 2013). O índice encontrado, neste estudo, é superior aos encontrados (21% e 26%) por Saif et al. (2011) e Doshi et al. (2013), respectivamente, que avaliaram a positividade para NoV em pacientes submetidos a TACPH. Entretanto, deve ser apontado que este estudo monitorou os pacientes transplantados por um longo período e prospectivamente e a maioria dos estudos (Roddie et al. 2009; Saif et al. 2011; Schwartz et al. 2011; Robles et al. 2012; Doshi et al. 2013), conduzida em hospitais ou UTMO, relata a ocorrência de surtos de

gastroenterite envolvendo principalmente crianças, sendo a detecção de NoV realizada em apenas uma amostra de cada paciente e de forma retrospectiva em fezes armazenadas.

Foi observada presença de RNA de NoV nas amostras de soro de 50% dos pacientes transplantados. Até o momento, apenas alguns estudos avaliaram a detecção de RNA no soro de pacientes infectados por NoV. Takanashi et al. (2009) relataram viremia em 15% das amostras de soro de crianças com gastroenterite aguda por NoV. Outro estudo em crianças hospitalizadas com imunodeficiências primárias, apresentando diarreia crônica, relatou viremia em 25% dos casos positivos para NoV (Frange et al. 2012). Fumian et al. (2013) detectaram, recentemente, NoV em 34,5% das amostras de soro coletadas de pacientes pediátricos hospitalizados no Brasil, menores de seis anos de idade, infectados por NoV.

A associação de excreção prolongada de NoV e diarreia crônica tem sido relatada em pacientes após serem submetidos ao TACPH (Robles et al. 2012; Doshi et al. 2013), bem como, em indivíduos que realizaram transplante de órgãos sólidos (Ebdrup et al. 2010; Schorn et al. 2010; Roos-Weil et al. 2011) e em indivíduos imunocomprometidos, como os pacientes que apresentam infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (Wingfield et al. 2010).

Neste estudo, os principais sintomas associados à infecção por NoV foram: diarreia, vômito e febre. O tempo médio de excreção viral foi de 61 dias, sendo que as amostras fecais do paciente 1 permaneceram positivas por mais de 140 dias. No entanto, apesar de todos os pacientes infectados por NoV terem apresentado diarreia, somente dois, do total de pacientes submetidos a TACPH, não apresentaram diarreia, não sendo portanto possível estabelecer uma relação direta entre a presença deste sintoma e positividade para o vírus.

Roddie et al. (2009) reportaram uma média de três meses de excreção de NoV em pacientes adultos que foram submetidos a TACPH. Schorn et al. (2010) também relataram infecção crônica por NoV, com persistente excreção viral e diarreia intermitente com duração variável (de 97-898 dias) em pacientes que receberam transplante renal. Outros estudos relatam diarreia crônica e infecção prolongada por CV em crianças com

doenças malignas, após essas receberem transplante intestinal, renal, e de medula óssea, ou com outras formas de imunocomprometimento (Kim et al. 2011; Saif et al 2011; Chehade et al. 2012; Robles et al. 2012; Munir et al. 2013).

Quanto à presença prolongada de RNA viral no soro, essa foi detectada em cinco pacientes, variando de 29 a 36 dias, com uma média de 34 dias. Apesar da viremia por NoV ter sido reportada anteriormente (Takanashi et al. 2009; Frange et al. 2012; Fumian et al. 2013), ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de monitoramento, à longo prazo, da presença de RNA no soro de indivíduos adultos infectados por NoV. Este dado vem a aumentar o conhecimento sobre a patogenia dos NoV e corroborar para a hipótese de que possa haver a disseminação dos NoVs, durante a infecção, para sítios além da mucosa do intestino delgado, ou até mesmo a persistência viral em algum sítio do organismo, como demonstrado por estudos da patogênese dos norovírus murinos (Wobus et al. 2006), e já sugerido por estudo em humanos (Takanashi et al. 2009).

Nos pacientes submetidos a TACPH, foi observada positividade para NoV, de outubro de 2012 a junho de 2013. A cidade de Goiânia possui clima tropical, com a presença de duas estações bem definidas: verão (estação chuvosa) que compreende os meses de setembro a março, e inverno (estação seca), no período de abril a agosto. Neste estudo, foram observados novos casos da infecção por NoV durante as duas estações, com uma pequena predominância no verão. Nos países da Europa e nos Estados Unidos, a infecção por NoV geralmente é mais frequente no inverno (Mounts et al. 2000). No Brasil, porém, há estudos que relatam a ocorrência de NoV em todos os meses do ano (Ferreira et al. 2012), e recentemente, um estudo de monitoramento da positividade para NoV, conduzido em Goiânia, também não relatou um padrão de sazonalidade para os NoV, tendo estes ocorrido tanto na estação seca quanto na estação chuvosa (De Oliveira et al. 2013). De acordo com Schalk et al. (2013), a incidência de infecção por NoV, em pacientes imunocomprometidos, não demonstra sazonalidade definida. Os autores ainda sugerem que a persistência da infecção por semanas a anos poderia explicar essa falta de sazonalidade.

Dos cinco pacientes que desenvolveram DECH, três apresentaram DECHa intestinal e todos esses foram infectados por NoV (pacientes 2, 3 e 6). No paciente 6, o diagnóstico clínico da DECHa intestinal ocorreu após a resolução da infecção por NoV. Em duas (pacientes 2 e 3), este diagnóstico foi confirmado durante o período da infecção por NoV. Ambas pacientes apresentaram um quadro diarreico mais grave, com um aumento considerável do número de evacuações por dia, sendo relatado até 30 evacuações, em um único dia, para a paciente 3. As pacientes 2 e 3 apresentaram diarreia com muco, e a paciente 3 apresentou, também, sangue, nas últimas amostras fecais coletadas. O tratamento realizado, para estes dois casos, consistiu no uso de ciclosporina, um imunossupressor. A paciente 2 apresentou melhora progressiva das manifestações clínicas, a paciente 3, entretanto, apresentou diarreia persistente, mesmo após a resolução da infecção por NoV. Outros estudos também relataram a associação da infecção por NoV e DECH e observaram melhora do quadro clínico dos pacientes após diminuição da dose do imunossupressor (Roddie et al. 2009; Doshi et al. 2012), entretanto deve-se ressaltar que esta mudança de conduta clínica, só pode ser realizada se houver o diagnóstico de infecção por NoV durante o acompanhamento dos pacientes, o que não é feito de rotina em nenhuma UTMO do mundo.

Dentre as intercorrências reportadas nos prontuários dos pacientes, destaca-se a reativação por citomegalovírus nas pacientes 2 e 4, as quais apresentaram também infecção por NoV. A reativação por citomegalovírus foi também observada em outro estudo, em dois de oito pacientes infectados por NoV (Robles et al. 2012), corroborando a importância da ocorrência de reativação deste agente em pacientes submetidos a TCPH (Ariza-Heredia et al. 2013).

Os pacientes 3, 7 e 9 vieram a óbito. Segundo informações do prontuário, a paciente 3 veio a óbito três meses e doze dias após o transplante, e a causa da morte foi “ falência múltipla de órgãos”, tendo como causas antecedentes hemorragia difusa, Síndrome de Sweet e aplasia medular. O paciente 7 veio a falecer quatro meses e 19 dias após o transplante, devido à choque séptico e recidiva da leucemia linfóide aguda. A paciente 9 evoluiu com púrpura trombocitopênica trombótica secundária à

ciclosporina e hemorragia cerebral, vindo a óbito dois meses após a realização do transplante. Não se pode afirmar que o pior prognóstico dos pacientes 3 e7 ocorreu em razão da infecção por NoV e, apenas um estudo conduzido por Schwartz et al. (2011) associou de forma direta a infecção por NoV com um pior prognóstico dos pacientes submetidos a TACPH.

Quanto à caracterização molecular das amostras, todas as amostras positivas foram caracterizadas como pertencentes ao genogrupo I, genótipo 3 (GI.3) dos NoV. Sendo observada uma elevada identidade nucleotídica entre as amostras positivas para NoV (fezes e soro) do mesmo paciente, quanto de pacientes diferentes, dado este que difere do estudo de Schorn et al. (2010) que observaram elevadas taxas de mutação em amostras de NoV GII.4, obtidas de pacientes submetidos a transplante renal, corroborando a elevada variabilidade genética característica de amostras pertencentes a este genogrupo (Lindesmith et al. 2012).

Todos os pacientes tiveram a primeira amostra positiva para NoV, após um período de 48 horas da admissão na UTMO, sugerindo, portanto, que nenhum deles tenha sido responsável por introduzir o agente no ambiente nosocomial (Sukhrie et al. 2011). Ademais, apesar da elevada identidade nucleotídica entre as amostras de diferentes pacientes, os novos casos de infecção por NoV ocorreram ao longo de todo o período de monitoramento (um ano), portanto, não podemos caracterizar os casos como parte de um surto, que é definido como a positividade para NoV de pelo menos dois pacientes, para o mesmo genótipo viral, em uma mesma semana (Mitchell et al. 1995; Morter et al. 2011).

O primeiro paciente a ser infectado por NoV (paciente 1) apresentou um maior período de excreção de NoV nas fezes podendo ter constituído fonte de disseminação para os outros pacientes. Contudo, não é possível saber como este paciente foi infectado por NoV. Uma das possibilidades seria a introdução do NoV no ambiente nosocomial por um dos acompanhantes ou, até mesmo, por um funcionário da UTMO.

Quanto à predominância da ocorrência de algumas variantes de NoV em determinados locais, dados da literatura revelam que amostras pertencentes ao genogrupo II estão mais associadas a surtos em locais que prestam assistência à saúde, e que variantes do genogrupo I, ocorrem com

mais frequência em surtos envolvendo água e alimentos contaminados (Matthews et al. 2012). No entanto, os pacientes da UTMO/HAJ/ACCGO consomem água mineral e alimentam-se, apenas, do que é preparado pelo serviço de nutrição hospitalar, o que diminui a possibilidade de ter ocorrido, nestes casos, infecção por água ou alimentos contaminados.

Schwartz et al. (2011) relataram infecção por NoV em pacientes, que realizaram TACPH e apontam para uma provável contaminação ambiental, a qual propiciou a disseminação dos NoV entre os pacientes, por meio do uso comum de quartos e banheiros. Mas os pacientes, deste estudo, têm quartos e banheiros individuais e, portanto a explicação mais plausível seria a persistência dos vírus, em condições ambientais, e consequente transmissão desses para os pacientes posteriores, ou até mesmo a reintrodução dos NoV no ambiente nosocomial com infecção de novos pacientes, através da excreção prolongada pelos pacientes previamente infectados.

O hospital propicia a disseminação viral em razão de ser um ambiente fechado com relativa aglomeração de pessoas imunocomprometidas, devido ao compartilhamento de equipamentos e utensílios por vários pacientes e a manipulação de diversos pacientes pelo mesmo grupo de funcionários. Morter et al. (2011) fizeram um monitoramento do ambiente hospitalar, onde eram relatados surtos repetidos de NoV, mesmo após a limpeza e desinfecção do ambiente, mostrando a resistência dos CV à inativação, o que contribui para a manutenção destes agentes virais e disseminação dos mesmos, resultando em altos índices de infecções nosocomiais.

Existem inúmeros fatores que contribuem para a ocorrência de surtos de gastroenterites nosocomiais com rápida disseminação dos NoV entre pacientes e profissionais da área da saúde: transmissão do vírus por via fecal-oral e por aerossóis provenientes de vômitos; excreção assintomática destes vírus por indivíduos saudáveis; prolongada excreção viral em pacientes imunocomprometidos; elevada carga viral excretada por pacientes infectados; baixa dose infecciosa, além da estabilidade desses vírus no ambiente e resistência à inativação (Marks et al. 2003; Atmar et al. 2008; Tenius et al. 2008; Sukhrie et al. 2011).

Os profissionais da saúde, funcionários da UTMO do HAJ/ACCGO e os acompanhantes, que tiveram contato com os pacientes que apresentaram infecção por NoV, não relataram manifestações clínicas, como diarreia ou vômito. No entanto, não foi possível obter informações mais claras sobre estes sintomas nestes indivíduos. Portanto, pode-se apenas inferir que em razão das características biológicas dos NoV, tenha havido persistência dos vírus no ambiente, ou mesmo a reintrodução contínua, por pacientes que excretavam vírus de forma crônica.

Harris e colaboradores (2013) avaliaram a proximidade espacial de casos de infecção por NoV em surtos hospitalares e viram que, em alas hospitalares pequenas, a transmissão do vírus ocorre, com mais facilidade, entre os pacientes, comparando-se com pacientes em diferentes alas. Assim, no nosso estudo, vimos a persistência do NoV, no ambiente da UTMO, e a consequente disseminação e transmissão entre os pacientes, os quais, em sua maioria, ficaram internados nos mesmos quartos dos primeiros pacientes que apresentaram a infecção.

Os dados obtidos neste estudo, ressaltam a necessidade urgente da implementação de um programa de controle de infecção hospitalar mais rígido, que contemple também os agentes virais, além da necessidade da inclusão da testagem para NoV nos exames de rotina realizados antes e após o transplante de células progenitoras hematopoiéticas. Os NoV podem causar graves surtos, neste grupo de pacientes, pois a diarreia sendo um sintoma comum tanto no pós-operatório, quanto no advento de DECH, torna difícil a suspeita e o diagnóstico diferencial dos NoV como sendo os agentes causadores da gastroenterite aguda ou crônica. Esta situação prejudica, até mesmo, na adoção de medidas de controle adequadas, pois os funcionários cuidadores, destes pacientes, pensam que estão lidando com pacientes que apresentam gastroenterites de origem não infecciosa.

## 7- CONCLUSÕES

● Foi observada a ocorrência de NoV em pacientes submetidos a TACPH, sendo detectado elevado índice (60%) de positividade para estes vírus, nas fezes e no soro;

● Não foi observada positividade para SaV nas amostras analisadas;

● Foi detectada, na maioria dos pacientes, excreção prologada de NoV nas fezes, bem como duração prolongada da presença de RNA viral nas amostras de soro

● Foi observada elevada identidade nucleotídica entre as amostras positivas para NoV, tanto entre as obtidas do mesmo paciente quanto as de pacientes diferentes, sendo todas caracterizadas como pertencentes ao genogrupo I, genótipo 3 (GI.3) dos NoV;

● Com relação à associação entre positividade para NoV e características apresentadas pelos pacientes foi observado que entre os pacientes infectados por NoV: a maioria (90%) pertencia ao grupo sanguíneo A+ ou O+ e todos tinham fenótipo Se+; os sintomas mais comumente apresentados foram diarreia, vômito e febre; houve desenvolvimento da DECHa intestinal em três dos seis pacientes, entretanto, não foi possível estabelecer significância estatística destas associações, em função do pequeno número de pacientes avaliados.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis 119*: 668-673, 1969.

Alkhouri N, Danziger-Isakov L. Norovirus and severe chronic gastroenteritis in pediatric stem cell transplantation: The plot thickens. *Pediatric Transplant 15*: 671-672, 2011.

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.

Ariza-Heredia EJ, Nesher L, Chemaly RF. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: A mini-review. *Cancer Lett 342(1):* 1-8, 2013.

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivatable 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, 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, 2011.

Azevedo W & Ribeiro MC. Fontes de Células Tronco- Hematopoiéticas para Transplantes. *Med 33:* 381-389, 2000.

Balman FF, Vaz RS, Fernandes A, Guimarães AT. Transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico e doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (DECHa): uma revisão de profilaxia e tratamento. *Rev Bras Alerg Imunopatol 32:* 211-216, 2009.

Bernard H, Höhne M, Niendorf S, Altmann D, Stark K. Epidemiology of norovirus gastroenteritis in Germany 2001-2009: eight seasons of routine surveillance. *Epidemiol Infect 21:*1-12, 2013.

Bok K, Green KY. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. *N Engl J Med 367*: 2126-2132, 2012.

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.

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

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*: 2587-2595, 2004.

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.

Castagnola E, Faraci M, Moroni C, et al. Rare viral infections in children receiving hemopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant 41*(Suppl 2): S100-S103, 2008.

Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR). Disponível em: http://www.cibmtr.org/pages/index.asp. Acesso em: 28/11/2013.

Chang YJ, Weng CL, Sun LX, Zhao YT. Allogeneic bone marrow transplantation compared to peripheralblood stem cell transplantation for the treatment of hematologic malignancies: a meta-analysis based on time-to-event data from randomized contolled trials. *Ann Hematol 91:* 427-437, 2012.

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.

Chehade H, Girardin E, Delich V, Pascual MA, Venetz JP, Cachat F. Acute norovirus-induced agranulocytosis in a pediatric Kidney transplant recipiente. *Transpl Infect Dis 14*: 27-29, 2012.

Chen SC, Tan LB, Huang LM, Chen KT. Rotavirus infection and the current status of rotavirus vaccines. *J Formos Med Assoc 111*:183-193, 2012.

Chen SY, Chiu CH. Worldwide molecular epidemiology of norovirus infection. *Paediatr Int Child Health 32(3):* 128-131, 2012.

Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T, Fukui S. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. J. *Med Virol 4*: 249-254, 1979.

Clarke IN & Lambden PR. Organization and expression of calicivirus genes. *J Infect Dis 181*: S309-S316, 2000.

Dai YC, Hu GF, Zhang XF, Song CL, Xiang WL, Wu XB, Wang LY, Jiang X, Nie J. Molecular epidemiology of norovirus gastroenteritis in children in Jiangmen, China, 2005-2007. *Arch Virol 156*: 1641-1646, 2011.

Danial J, Cepeda JA, Cameron F, Cloy K, Wishart D, Templeton KE. Epidemiology and costs associated with norovirus outbreaks in NHS Lothian, Scotland 2007-2009. *J Hosp Infect 79*: 354-358, 2011.

Danziger-Isakov L. Gastrointestinal infections after transplantation. *Curr Opin Gastroenterol 30:* 1-7, 2013.

De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol 11(7):* 1529-44, 2011.

De Oliveira DMM, Souza M, Fiaccadori FS, Santos HCP, das Dôres DPC. 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,* 2013.

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

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.

Doane FW. Electron microscopy for the detection of gastroenteritis viruses. *In:* Kapikian AZ. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. Marcel Dekker, New York, 1994.

Dolin R, Blacklowi 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.

Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric R. No pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *J compilat 225*: 190-211, 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 norovírus infection in a bone marrow transplant unit. *Am J Inf Con 41*: 820-823, 2013.

Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of Caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol 70*: 4538-4543, 2004.

Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. J Gen Virol *85*: 79-87, 2004.
Ebdrup L, Böttiger B, Mølgaard H, Laursen AL. Devastating diarrhoea in a heart-transplanted patient. *J Clin Virol 50*: 263-265, 2010.

Edward A, Copelan MD. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med 354*:1813-1826, 2006.

Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humprey CD, Bresee JS, Parashar UD, Ando T, Glass RI. Epidemiologic and molecular trends of Norwalk-like viruses associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis 186*: 1-7, 2002.

Fastier LB. A new feline virus isolated in tissue culture. *Am J Vet Res 18*, 382-389, 1957.

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.

Frange P, Touzot F, Debré M, Héritier S, Leruez-Ville M, Cros G, Rouzioux C, Blanche S, Fischer A, Avettand-Fenoël V. Prevalence and clinical impact of norovirus fecal shedding in children with inherited immune deficiencies. *J Infect Dis 206*: 1269-1274, 2012.

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 bloo d from children hospitalized for acute gastroenteritis in Belém, Brazil. *J Clin Virol 58(1):* 31-35, 2013.

Gallimore CI, Cubitt D, du Plessis N, Gray JJ. Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol 42*: 271-274, 2004.

Garcia C, Dupont HL, Long KZ, Santos JI, Ko G. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J Clin Microbiol 44*: 2997-3000, 2006.

George S, Menon VK, Ramani S, Kang G. Comparison of primers for the detection of genogroup II noroviruses in India. *Indian J Med Microbiol 30*: 24-29, 2012.

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.

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

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

Harris JP, Lopman BA, Cooper BS, O'Brien SJ. Does spatial proximity drive norovírus transmission during outbreaks in hospitals? *BMJ Open 3:* e003060, 2013.

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

ICTV dB Management (2012). *Caliciviridae*. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA 2012, International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

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

Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW & Matson DO. Design and evolution of a primer pair that detects both norwalk-like and sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virological Methods 83*: 145-154, 1999.

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, Gerin JL, Wyatt RG, Thornhill TS, Chanock RM. Density in cesium chloride of the 27 nm "8FIIa" particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis: determination by ultra-centrifugation and immune electron microscopy. *Proc Soc Exp Biol Med 42*: 874-877, 1973.

Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, Singh N, Schonberger LB, Feldman R & Greenber HB. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Int Med 96*: 756-761, 1982.

Khamrin P, Nguyen TA, Phan TG, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovírus antigen in stool samples. *J Virol Methods 147:* 360-363, 2008.

Khamrin P, Takanashi S, Chan-It W, Kobayashi M, Nishimura S, Katsumata N, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. *J Virol Methods 157*: 219-222, 2009.

Kim MJ, Kim YJ, Lee JH, Lee JS, Kim JH, Cheon DS, Jeong HS, Koo HH, Sung KW, Yoo KH, Choe YH. Norovirus: A Possible Cause of Pneumatosis Intestinalis. *Pediatr Gastroenterol Nutr 52*: 314-318, 2011.

Kittigul L, Panjangampatthana A, Pombubpa K, Taweekate Y, Pungchitton S, Diraphat P, Siripanichgon K.Detection and genetic characterization of norovirus in environmental water samples in Thailand*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 43*: 323-332, 2012.

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*: 107-114, 2002.

Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol 90*: 23-41, 2004.

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

Larsson MM, Rydell GE, Grahn A, Rodriguez- Diaz J, Akerlind B, Hutson AM, Estes MK, Larson G, Svensson L. Antibody Prevalence and Titer to Norovirus (Genogroup II) Correlate with Secretor (FUT2) but Not with ABO Phenotype or Lewis (FUT3) Genotype. *J Infect Dis 194*: 1422-1427, 2006.

Lee C, Cheong S, Lee HJ, Kwon M, Kang I, Oh EG, Yu HS, Shin SB, Kim SJ. Evaluation of the sensitivity and specificity of primer pairs and the efficiency of RNA extraction procedures to improve noroviral detection from oysters by nested reverse transcription-polymerase chain reaction. J Microbiol 48: 586-593, 2010.

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.

Liakopoulou E, Mutton K, Carrington D, Robinson S, Steward CG, Goulden NJ, Cornish JM, Marks DI. Rotavirus as a significant cause of prolonged diarrhoeal illness and morbidity following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant 36(8):* 691-694, 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 L, Moe C, LePendu, J, Frelinger JA, TreanorJ, Baric RS. Cellular and Humoral Immunity following Snow Mountain Virus Challenge. *J Virol 79(5):* 2900-2909, 2005.

Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, Baruc R. S. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med 5*: 269-290, 2008.

Lindesmith LC, Debbink K, Swanstrom J, Vinje J, Costantini V, Baric RS, Donaldson EF. Monoclonal antibody-based antigenic mapping of norovírus GII.4. *J Virol 86*: 873-883, 2012.

Lindesmith LC, Beltramello M, Eric FD, Corti D, Swanstrom J, Debbink K, Lanzavecchia A, Baric RS. Immunogenetic Mechanisms Driving Norovirus GII.4 Antigenic Variation. *PlosPathogens 8:* e1002705, 2012.

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.

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.

Marionneau S, Cailleau- Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoen N, Clément M, Le Pendu J. ABH and Lewis histo- blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie 83*: 565-573, 2001.

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, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect 124*: 481-487, 2000.

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.

Matsui SM & Greenberg HB. Immunity to calicivirus infection. *J Infect Dis 181*: 331-335, 2000.

Matthews RE. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirol 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)*: 1161-1172, 2012.

Mitchell DK, Monroe SS, Jiang X, Matson DO, Glass RI, Pickering LK. Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Infect Dis 172:* 1437-1444, 1995.

Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Ribeiro CD, Calux SJ, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Large gastroenteritis outbreak due to norovirus GII in São Paulo, Brazil, summer 2010. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo 53*: 119-120, 2011.

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.

Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Gallimore C, Adak GK, Gray JJ, Brown DW. Could weather seasonanlity of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis 181:* S284-S287, 2000.

Munir N, Liu P, Gastañaduy P, Montes J, Shane A, Moe C. Norovirus infection in immunocompromised children and children with hospital-acquired acute gastroenteritis. *J Med Virol,* 2013.

Nelson AM, Walk ST, Taube S, Taniuchi M, Houpt ER, Wobus CE, Young VB. Disruption of the human gut microbiota following Norovirus infection. *PLoS One 7(10):* e48224, 2012.

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

Nguyen TA, Khamrin P, Takanashi S, Le Hoang P, Le Pham D, Hoang KT, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography tests for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. *J Trop Pediatr 53:* 264-269, 2007.

Nordgren J, Nitiema LW, Ouermi D, Simpore J, Svensson L. Host genetic factors affect susceptibility to Norovirus infections in Burkina Faso. *Plos One 8*: 1-10, 2013.

Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol 157*: 349-52, 2012.

Oriol R, Candellier JJ & Mollicone R. Molecular genetics of H. *Vox Sang 78*: 105-108, 2000.

Papafragkou E, Hewitt J, Park GW, Greening G, Vinjé J. Challenges of Culturing Human Norovirus in Three-Dimensional Organoid Intestinal Cell Culture Models. *PLoS ONE 8(6):* 1-7, 2013.

Parashar U, Quiroz ES, Mounts AW, Monroe SS, Fankhauser RL, Ando T, Noel JS, Bulens SN, Beard SR, Li JF, Bresee JS, Glass RI. “Norwalk-like viruses”: Public health consequences and outbreak management. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep 50*: 1-17, 2001.

Parra GI, Bok K, Taylor R, Haynes JR, Sosnovtsev SV, Richardson C, Green KY. Immunogenicity and specificity of norovirus Consensus GII.4 virus-like particles in monovalent and bivalent vaccine formulations. *Vaccine 30*: 3580-3586, 2012.

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.

Paton EJA, Coutinho MA, Voltarelli JC. Diagnóstico e tratamento de complicações agudas do transplante de células progenitoras hematopoiéticas. *Medicina Ribeirão Preto 33:* 264-277, 2000.

Phillips G, Lopman B, Tam CC, Iturriza-Gomara M, Brown D, Gray J. Diagnosing norovírus-associated infectious intestinal disease using viral load. *BMC Infect Dis 9:* 63, 2009.

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.

Richardson C, Bargatze RF, Goodwin R, Mendelman PM. Norovirus virus-like particle vaccines for the prevention of acute gastroenteritis. *Expert Rev Vaccines 12(2):*155-167, 2013.

Robles JDF, Cheuk DKL, HaSY, Chiang AKS, Chan GCF. Norovirus Infection in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients: Incidence, Risk, Factors, and Outcome. *Am Soc for Blood and Marrow Transp 18*: 1883-1889, 2012.

Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinjé J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, Koopmans M. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis 35*: 246-253, 2002.

Roddie C, Paul JPV, Benjamin R, Gallimore CI, Xerry J, Gray JJ, Peggs K S, Morris EC, Thomson KJ, Ward KN. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and norovirus gastroenteritis: a previously unrecognized cause of morbidity. *Infect Dis Society of America 49:* 1061-1068, 2009.

Roos-Weil D, Ambert-Balay K, Lanternier F, Mamzer-Bruneel MF, Nochy D, Pothier P, Avettand-Fenoel V, Anglicheau D, Snanoudj R, Bererhi L, Thervet E, Lecuit M, Legendre C, Lortholary O, Zuber J. Impact of norovirus/sapovirus-related diarrhea in renal transplant recipients hospitalized for diarrhea. *Transplantation 92*: 61-69, 2011.

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.

Rynans S, Dzieciątkowski T, Młynarczyk G. Adenovirus infection in immunocompromised patients. *Postepy Hig Med Dosw 67:* 964-972, 2013.

Sai L, Wang G, Shao L, Liu H, Zhang Y, Qu C, Ma L. Clinical and molecular epidemiology of norovirus infection in adults with acute gastroenteritis in Ji'nan, China. *Arch Virol 158(11):* 2315-2322, 2013.

Saif MA, Bonney DK, Bigger B, Forsythe L, Williams N, Page J, Babiker ZO, Guiver M, Turner AJ, Huges S, Wynn RF. Chronic norovírus infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients: A cause of prolonged intestinal failure requiring intensive nutritional support. *Pediatri Transplantation 15*: 505-509, 2011.

Schalk, E, Geginat G, Schulz C, Schlüter D, Fischer T. The incidence of norovírus infections in cancer patients show less seasonal variability compared to patients with other diseases. *Ann Hematol*, letter to the editor, 2013.

Schorn R, Höhne M, Meerbach A, Bossart W, Wüthrich RP, Schreier E, Müller NJ, Fehr T. Chronic norovirus infection after kidney transplantation: molecular evidence for immune- driven viral evolution. *Clin Infect Dis 51*: 307-314, 2010.

Schwartz S, Vergoulidou M, Schreier E, Loddenkemper C, Reinwald M, Scmidt- 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.

Seah EL, Marshall JA, Wright PJ. Trans activity of the norovirus Camberwell proteinase and cleavage of the N- terminal protein encoded by ORF1. *J Virol 77*: 11790-11797, 2003.

Sestak K, Feel S, Fey B, Dufour J, Hargitt E, Alvarez X, Pahar B, Gregoricus N, Vinje J, Farkas T. Experimental inoculation of juvenile Rhesus Macaques with primate enteric caliciviruses. *PLoS ONE 7:* e37973, 2012.

Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru City, Japan. *Infect Genet Evol 7*: 279-284, 2007.

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.

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.

Siddiq DM, Koo HL, Adachi JA, Viola GM. Norovirus gastroenteritis successfully treated with nitazoxanide. J Infect. 63(5): 394-*397*, 2011.

Siebenga JJ, Vennema H, Duizer E, Koopmans MP. Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4, the Netherlands, 1994–2005. *Emerg Infect Dis 13*: 144-146, 2007.

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, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, Ho EC, Lim W, Choudekar A, Broor S, Halperin T, Rasool NB, Hewitt J, Greening GE, Jin M, Duan ZJ, Lucero Y, O'Ryan M, Hoehne M, Schreier E, Ratcliff RM, White PA, Iritani N, Reuter G, Koopmans M. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of Norovirus GII.4 Variants. *J Infect Dis 200*: 802-812, 2009.

Simmons K, Gambhir M, Leon J, Lopman B. Duration of Immunity to Norovirus Gastroenteritis. *Emerg Infect Dis 19:* 1260-1267, 2013.

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, Costantini V, Azevedo MSP, Saif LJ. A human norovirus-like particle vaccine adjuvanted with ISCOM or mLT induces cytokine and antibody responses and protection to the homologous GII.4 human norovirus in a gnotobiotic pig disease model. *Vaccine 25:* 8448-8459, 2007.

Sukhrie FH, Beersma MF, Wong A, van der Veer B, Vennema H, Bogerman J, Koopmans M. Using molecular epidemiology to trace transmission of nosocomial norovirus infection. *J Clin Microbiol 49*: 602-606, 2011.

Takanashi S, Hashira S, Matsunaga T, Yoshida A, Shiota T, Tung PG, Khamrin P, Okitsu S, Mizuguchi M, Igarashi T, Ushijima H. Detection, genetic characterization, and quantification of norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. *J Clin Virol 44*: 161-163, 2009.

Tam CC, O'Brien SJ, Tompkins DS, Bolton FJ, Berry L, Dodds J, Choudhury D,Halstead F, Iturriza-Gómara M, Mather K, Rait G, Ridge A, Rodrigues LC, Wain J,Wood B, Gray JJ; IID2 Study Executive Committee. Changes in causes of acute gastroenteritis in the United Kingdom over 15 years: microbiologic findings from 2 prospective, population-based studies of infectious intestinal disease. *Clin Infect Dis 54(9*):1275-1286, 2012.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol 28*: 2731-2739, 2011.

Tan M, Jiang X. The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol* 79: 14017-14030, 2005.

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.

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.

Thornton AC, Jennings-Conklin KS, McCormick MI. Noroviruses. Agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Manag Response 2*: 4-9, 2004

Thorven M, Grahn A, Hedlund KO, Johansson H, Wahlfrid C, Larson G, Svensson L. A homozygous nonsense mutation (428G–.A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections*. J Virol 79*: 15351-15355, 2005.

Treanor JJ, Dolin R. Norwalk virus and other caliciviruses. In: Mandell GL, Bennett JE. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone *2*: 1949-1956, 2000.

Ushijima H. Diagnosis and molecular epidemiology of viral gastroenteritis in the past, present and future. Uirusu 59(1):75-90, 2009.

Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J. Genotypic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States, 2009-2013. *J Clin Microbiol*, 2013.

Verhoef L, Koopmans M, VAN Pelt W, Duizer E, Haagsma J, Werber D, VAN Asten L,Havelaar A. The estimated disease burden of norovirus in The Netherlands. *Epidemiol Infect 17*: 1-11, 2012.

Vicentini F, Denadai W, Gomes YM, Rose TL, Ferreira MSR,Le Moullac V, Le Pendu J, Leite JPG, Miagostovich MP, Spano LC. Molecular Characterization of Noroviruses and HBGA from Infected Quilombola Children in Espirito Santo State, Brazil. *PLoS ONE 8(7):* e69348, 2013.

Vigorito AC, De Souza CA. Transplante de células-tronco hematopoiéticas e a regeneração da hematopoese. *Rev Bras Hematol Hemoter 31*: 280-284, 2009.

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.

Vivancos R, Keenan A, Sopwith W, Smith K, Quigley C, Mutton K, Dardamissis E, Nichols G, Harris J, Gallimore C, Verhoef L, Syed Q, Reid J. Norovirus outbreak in a cruise ship sailing around the British Isles: investigation and multi-agency management of an international outbreak. *J Infect 60*: 478-485, 2010.

Wingfield T, Gallimore CI, Xerry J, Gray JJ, Klapper P, Guiver M, Blanchard TJ. Chronic norovirus infection in an HIV-positive patient with persistent diarrhoea: a novel cause. *J Clin Virol 49(3):* 219-222, 2010.

Wobus CE, Thackray LB, Virgin 4th HW. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol (80)*: 5104-5112, 2006.

World Health Organization (WHO). Diarrhoeal disease. Key facts. 2009. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html. Acesso em 27.12.12.

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.

Xavier MPTP, Oliveira SA, Ferreira MSR, Victoria M, Miranda V, Silva MFM, Strina A, Barreto ML, Miagostovicht MP, Leite JPG. Detection of calicivírus associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. Braz J Biol Res 42: 438-444, 2009.

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

Yan H, Yagyu F, Okitsu S, NishioI O, Ushijima H. Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods 114*: 37-44, 2003.

Zhang H, Chen L, Que W. Allogeneic peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation for hematologic malignancies: meta-analysis of randomized controlled trials. *Leuk Res36:* 431-437, 2012.

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

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

# 9- APÊNDICES E ANEXOS

**Apêndice 1.** Termo de consentimento livre e esclarecido

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**
**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você, ou a pessoa pela qual você é responsável, está sendo convidado a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, se você concordar que o mesmo faça parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável que também deverá assinar o documento. Em caso de dúvidas, esclareça-as junto à equipe, para decidir se participa ou não do estudo. Em caso de recusa, você não será penalizado de nenhuma forma.

1- **Instituição**: Universidade Federal de Goiás

2- **Órgão**: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

**Projetos de Pesquisa**: **ESTUDO PROSPECTIVO DE INFECÇÃO POR CALICIVÍRUS (NOROVÍRUS E SAPOVÍRUS) EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO OU AUTÓLOGO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS (TACPH)**

3- **Coordenadora**: Profª Drª Menira Borges de Lima Dias e Souza

Telefones para contato: (62) 3209-6122 (62) 9992-7608

4- **Participantes**: Profª Drª Menira Borges de Lima Dias e Souza, Prof. Dr. Adriano de Moraes Arantes, Profª Drª Fabíola Souza Fiaccadori; Profª Drª Divina das Dôres de Paula Cardoso, Lucianna, Gonçalves Nepomuceno Lemos, Denise Marques Mendanha, Hugo César Pereira Santos

5- **Informações gerais**: é importante a leitura deste documento sobre os princípios gerais que se aplicam aos participantes:

a) a sua participação é voluntária; Será realizada uma entrevista pelos pesquisadores, após consentimento dos participantes. O questionário a ser utilizado será constituído de duas partes, sendo a primeira referente aos dados pessoais e a segunda parte sobre fatores de riscos associados às infecções causadas pelos vírus a serem pesquisados.

b) a coleta se dará no hospital (unidade de transplante ou ambulatório) pelos enfermeiros da Unidade. Serão utilizados para a coleta, coletores plásticos, agulhas e seringas descartáveis e o procedimento não confere risco à integridade física do paciente, caso o mesmo se oponha a coleta não será realizada.

c) o material clínico (fezes ou soro) colhido ficará sob nossa guarda e responsabilidade (será armazenado a -20°C no laboratório de virologia humana/IPTSP), durante a execução desta pesquisa e para a realização de estudos futuros para a detecção de outros vírus que infectam humanos;

d) o(a) senhor(a) possui total liberdade para retirar o seu consentimento a qualquer momento, deixando apenas de participar do estudo e sem prejuízos para a sua pessoa.

6- **Objetivo geral**: Monitorar 40 pacientes submetidos ao transplante de medula óssea (ou transplante de células progenitoras hematopoiéticas –TCPH), para a infecção por calicivírus (norovírus/sapovírus)

**7-Referencial Teórico/Justificativas:**

Os calicivírus (norovírus e sapovírus) são importantes agentes causadores de diarréia aguda, podendo causar doença grave em pacientes imunocomprometidos, como os pacientes que sofreram transplante e se encontram em tratamento imunossupressor. A excreção assintomática de NoVs por indivíduos saudáveis, a excreção viral prolongada em pacientes imunocomprometidos, a elevada carga viral excretada, baixa dose infecciosa, além da estabilidade dos NoVs no ambiente e resistência à inativação são fatores que contribuem para a ocorrência de surtos em ambiente hospitalar com rápida disseminação viral entre pacientes e profissionais da área de saúde (enfermeiros e médicos). **O diagnóstico da infecção por NoV/SaV não faz parte da rotina do acompanhamento de pacientes que foram submetidos ao transplante e o uso de terapia imunossupressora nestes pacientes pode levar ao agravamento de sua condição clínica, podendo resultar em óbito. Sendo, portanto, importante o diagnóstico precoce de infecção por estes agentes para que o tratamento mais eficaz seja definido e avaliado.**

**8- Considerações finais**: Os resultados obtidos nesta pesquisa poderão ser utilizados na totalidade para fins exclusivos de divulgação científica da pesquisa, garantindo-se a privacidade dos dados individuais. Não será efetuado qualquer tipo de remuneração durante ou após os procedimentos de coleta e se porventura existirem gastos adicionais relacionados à investigação estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

9- Eu,....., nascido em ...../...../....., RG....., abaixo assinado, tendo recebido as informações acima e ciente dos meus direitos, concordo com a participação no estudo.

10 -**Direitos do entrevistado**: a) garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa; b) segurança de não ser identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade;

..... de ..... de 2012

---

Assinatura do Coordenador da Pesquisa

---

Assinatura do entrevistado

**Apêndice 2.** Ficha de investigação clínica

**INVESTIGAÇÃO CLÍNICA DE DOENÇA DIARRÉICA**

DATA DE COLETA ___/___/___ LOCAL DE COLETA _____

1 – DADOS DO PACIENTE:

NOME DO PACIENTE: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____ FALAR COM: _____

SEXO: MASCULINO ( ) FEMININO ( )

DATA DE NASCIMENTO ___/___/___

2 – HISTÓRIA CLÍNICA:

NÚMERO DE DIAS COM GASTROENTERITE: ( )1 ( )2 ( )3 ( )4 ( )5 ( )> 5

TEMPERATURA CORPORAL: _____

VÔMITO: _____ NÃO ( ) SIM ( )

DIARRÉIA: _____ NÃO ( ) SIM ( )

( ) LÍQUIDA ( ) SEMI-LÍQUIDA ( ) PASTOSA

FEBRE: _____NÃO ( ) SIM ( )

QUEIXA RESPIRATÓRIA: __ NÃO ( ) SIM ( )

CORIZA : _____NÃO ( ) SIM ( )

DOR ABDOMINAL: _____ NÃO ( ) SIM ( )

SANGRAMENTO :_____NÃO ( ) SIM ( )

ICTERÍCIA: _____ NÃO ( ) SIM ( )

PRESENÇA DE LESÃO DE PELE : NÃO ( ) SIM ( )

OUTROS: _____

Assinatura do responsável pela coleta dos dados:_____

**Anexo 1.** Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG

UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**
**CEP - UFG**

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

**I – Identificação**

Título do projeto: "ESTUDO PROSPECTIVO DE INFECÇÃO POR CALICIVÍRUS (NOROVÍRUS E SAPOVÍRUS) EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS".

**Pesquisador responsável**

Nome: Menira Borges de Lima Dias e Souza
http://lattes.cnpq.br/0054562567103606
Instituição: Universidade Federal de Goiás
Endereço para correspondência: Rua 235, esquina com 1ª Avenida, sem número, Setor Universitário
Telefone: 62-32096122
Fax: 62-35211839
E-mail: menirasouza@gmail.com

**Pesquisadores participantes**

Nome: Divina das Dores de Paula Cardoso/ http://lattes.cnpq.br/9770835116155857
Instituição: Universidade Federal de Goiás

Nome: Fabíola Souza Fiaccadori/ http://lattes.cnpq.br/0993842409303174
Instituição: Universidade Federal de Goiás

Nome: Lucianna Gonçalves Nepomuceno Lemes/ http://lattes.cnpq.br/0816025025526987
Instituição: Universidade Federal de Goiás

Nome: Denisy Marques Mendanha/ http://lattes.cnpq.br/0916158945285630
Instituição: Universidade Federal de Goiás

Nome: Hugo César Pereira Santos http://lattes.cnpq.br/2936658105441688
Instituição: Universidade Federal de Goiás

Nome: Adriano de Moraes Arantes http://lattes.cnpq.br/2074071976957154
Institutição: Hospital Araújo Jorge/Associação de Combate ao Câncer em Goiás

Instituição onde se realizará: Universidade Federal de Goiás/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Publica (IPTSP/UFG).

- Data de apresentação ao CEP: 21/12/2011; N° 429/2011

**II – Resumo do projeto**

Os calicivírus (norovírus e sapovírus) são importantes agentes etiológicos da gastroenterite aguda epidêmica não bacteriana, causando surtos em diferentes grupos populacionais e em diversas partes do mundo. Estudos recentes mostram a importância destes agentes como causadores de diarréia crônica grave em pacientes imunodeprimidos, como os que foram submetidos a transplante renal ou transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas (TACPH), podendo a infecção por calicivírus levar ao agravamento do quadro

1/3 [illegible]

UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**
**CEP - UFG**

de imunosupressão destes pacientes, resultando em óbito. Pretende-se com este estudo avaliar a ocorrência de norovírus (NoV) e sapovírus (SaV) em pacientes que foram submetidos a TACPH, proceder à caracterização molecular das amostras positivas para NoV/SaV, investigar a ocorrência de viremia por estes vírus nestes pacientes, avaliar a susceptibilidade/resistência à infecção por estes agentes em relação ao seu grupo sanguíneo e fenótipo Lewis e secretor, a fim de fornecer subsídios que possam auxiliar na inclusão de um teste diagnóstico sensível e específico para o diagnóstico diferencial nos casos de suspeita de doença do enxerto contra o hospedeiro.

**III – Objetivos**

**3.1- Geral:**

- Monitorar 40 pacientes submetidos ao TACPH, para a infecção por NoVs/SaVs

**3.2- Específicos:**

- Realizar o acompanhamento clínico dos pacientes para a avaliação dos principais sinais e sintomas apresentados após o TACPH. Detectar NoVs/SaVs em amostras fecais coletadas de pacientes submetidos ao TACPH
- Realizar o sequenciamento genômico de um segmento da região codificadora do capsídeo viral das amostras positivas para NoV/SaV
- Pesquisar RNA viral (NoVs/SaVs) no soro dos pacientes (determinação de viremia)
- Determinar o grupo sanguíneo e do fenótipo secretor e de Lewis dos pacientes
- Realizar análise comparativa dos dados obtidos para avaliar: sinais e sintomas mais comuns, duração da excreção viral, presença ou não de viremia, maior ou menor susceptibilidade à infecção por NoVs/SaVs em relação ao grupo sanguíneo/fenótipo secretor e de Lewis dos pacientes, piora do quadro clínico em relação à terapia imunossupressora
- Relacionar os dados obtidos com os de outros estudos já realizados

**IV – Comentários do relator, frente à Resolução CNS 196/96 e complementares em particular sobre:**

**Estrutura do Protocolo:** (verificação dos documentos solicitados): a documentação está adequada (folha de rosto CEP-UFG, folha de rosto CONEP, comprovante de aprovação do projeto pela Diretoria da Instituição, termo de compromisso dos pesquisadores, modelos de questionários para entrevistas); o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi adequadamente escrito, de forma clara e sucinta. O termo de anuência do Hospital Araújo Jorge não foi apresentado (entretanto, citam que o projeto será apresentado, também, ao Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG).

**Resumo do projeto e indicação dos objetivos:** o resumo está claro e os objetivos são adequados para as pretensões do projeto e coerentes com a abordagem metodológica.

**Projeto de pesquisa:**

_ **Análise das questões éticas:** Os autores tecem comentários acerca preceitos ético-legais de acordo com a Resolução CNS 196/96, ressaltando a confidencialidade e a não identificação dos participantes. Adicionalmente, descreve como será a aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

2/3

UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**
**CEP - UFG**

_ **Avaliação de riscos e benefícios:** adequada; ressaltam o baixo risco, já que haverá aplicação do questionário e análise de material fecal e do sangue, sendo o primeiro coletado de forma não invasiva e, o segundo, com agulhas e seringas convencionais (ressaltam o risco de algum desconforto e a possibilidade de formação de hematoma no local da punção); para reduzir a chance de constrangimento, os aplicadores dos questionários e aqueles que lidarão com os pacientes e com as amostras, são devidamente treinados. O benefício direto refere-se aos resultados dos exames, que poderão ser úteis aos pacientes imunossuprimido, já que a pesquisa dos vírus já citados não é atividade, ainda, rotineira.

_ **Análise da metodologia e sua adequação aos objetivos da pesquisa**: a metodologia foi muito bem descrita, e obedece a protocolos já estabelecidos para este tipo de estudo, de inquérito epidemiológico prospectivo.

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:**

_ **Avaliação do processo de obtenção do Termo de Consentimento**:
_ Análise do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (adequação da linguagem e observância dos aspectos solicitados no item 4 do Protocolo): a linguagem está adequada, direta, com termos apropriados para a população (letrada) em geral. É explicado que, após o esclarecimento sobre a pesquisa, os sujeitos assinarão o TCLE, no local onde será aplicado o questionário, e que as amostras de fezes e de sangue serão utilizadas, apenas, para esta pesquisa.

_ **Verificação das garantias de privacidade e confidencialidade**: os autores destacam a não-identificação dos sujeitos (uso de códigos alfanuméricos e questionário sem identificação do sujeito) e a restrição de manipulação de dados pessoais (somente os pesquisadores terão acesso). As amostras serão armazenadas, codificadas, em freezer -20° C no Laboratório de Virologia do IPTSP.

**V – Parecer do CEP**

O parecer é pela **APROVAÇÃO** do presente projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG.

**VI – Data da reunião**

Goiânia, 19 de março de 2012.

**Prof. Dr. João Batista de Souza**
Coordenador CEP-UFG

Prof. João Batista de Souza
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / UFG

**Anexo 2.** Parecer do Comitê de Ética do HAJ/ACCGO

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS - ACCG

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A avaliação de riscos e benefícios esta adequada. O risco para os pacientes é baixo pois relatam que serão coletadas amostras de fezes e de sangue por profissionais treinados e especializados,utilizando material descartável.Ressaltam ainda que um médico hematologista responsável pela unidade de transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas estara disponível a prestar assistência em caso de necessidade.Em relaçao aos benefícios os dados obtidos podem auxiliar no fornecimento subsídios para que um teste sensível e específico para a detecção de NoVs/SaVs que possa ser utilizado durante o acompanhamento de pacientes que receberam o TACPH.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O pesquisador responsavel apresenta folha de rosto CONEP;folha de rosto CEP-ACCG; carta de aprovação do CEP -UFG; comprovante de aprovação do projeto pela diretoria do Hospital Araujo Jorge; Carta do chefe do arquivo medico autorizando acesso aos documentos; Carta do chefe do serviço de transplante de medula óssea para desenvolvimento da pesquisa; Termo de compromisso dos pesquisadores garantindo sigilo sobre identidade dos pacientes e dados da pesquisa; modelos de questionario para entrevista.Carta de financiamento Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnologia (CNPq) Nº 14/2011 .

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto CEP-ACCG arroneamente preenchida foi justificada e esclarecida no documento "carta ao CEP_24092012.pdf".
Consideramos pesquisadora principal Consideramos pesquisadora principal Dra Menira Borges Dias de Lima e Souza e Instituição proponente Universidade federal de Goias.

**Recomendações:**

Folha de rosto CEP-ACCG arroneamente preenchida foi justificada e esclarecida no documento "carta ao CEP_24092012.pdf".
Consideramos pesquisadora principal Dra Menira Borges e Instituição proponente Universidade Federal de Goias.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Folha de rosto CEP-ACCG arroneamente preenchida foi justificada e esclarecida no documento "carta ao CEP_24092012.pdf".
Consideramos pesquisadora principal Consideramos pesquisadora principal Dra Menira Borges Dias de Lima e Souza e Instituição proponente Universidade Federal de Goias.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado.

**Endereço:** 239
**Bairro:** SETOR LESTE UNIVERSITARIO **CEP:** 74.605-070
**UF:** GO **Município:** GOIANIA
**Telefone:** (62)3243-7050 **Fax:** (62)3243-7050 **E-mail:** cepaccg@accg.org.br