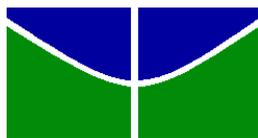


Denise Takamatsu

Detecção por imunoensaio e caracterização molecular  
de isolados de Norovírus genogrupo II do Distrito  
Federal de 2006 a 2008

Brasília-DF, 2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Denise Takamatsu

Detecção por imunoenensaio e caracterização molecular  
de isolados de Norovírus genogrupo II do Distrito  
Federal de 2006 a 2008

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

Brasília-DF  
2011

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de  
Brasília. Acervo 990452.

Takamatsu, Denise.  
T136d Detecção por imunensaio e caracterização molecular  
de isolados de Norovirus genogrupo II do Distrito  
Federal de 2006 a 2008 / Denise Takamatsu. -- 2011.  
45 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília,  
Faculdade de Medicina, Pós-Graduação em Patologia  
Molecular, 2011.

Inclui bibliografia.

Orientação: Tatsuya Nagata.

1. Sistema gastrointestinal - Doenças. 2. Patologia  
molecular. I. Nagata, Tatsuya. II. Título.

CDU 616.3

Denise Takamatsu

Detecção por imunoenensaio e caracterização molecular de isolados de  
Norovírus genogrupo II do Distrito Federal de 2006 a 2008

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Comissão Examinadora

---

Prof. Dr. Tatsuya Nagata  
Universidade de Brasília

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Andreia Silva  
Universidade Católica de Brasília

---

Prof. Dr. Luis Isamu Barros Kanzaki  
Universidade de Brasília

Brasília, 3 de março de 2011

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus amados pais,  
prova irrefutável de que Deus existe,  
pelos exemplos de responsabilidade e respeito,  
pelo incentivo incansável e constante,  
pelo amor incondicional,  
pelo carinho mais gratuito e sublime,  
que sempre dedicaram a mim.*

*A vocês,  
a minha singela homenagem  
e mais sincera e eterna gratidão.*

## **AGRADECIMENTOS**

No momento de finalização de um projeto de vida, é essencial e inevitável lembrarmos-nos de todos que estiveram presentes nesta caminhada. Sendo assim, deixo registrado o meu eterno agradecimento:

**A Deus**, força infinita em todos os momentos. Obrigada pelo dom da vida e por permitir que eu desfrute cada dia com muita saúde, felicidade, amor e paz, na companhia de uma família maravilhosa e de amigos que carrego para a vida inteira.

**Ao meu orientador**, Dr. Tatsuya Nagata, por transmitir seus infindáveis ensinamentos, pela paciência e compreensão, pelos auxílios e sugestões que me conduziram à busca de novos conhecimentos, pelo exemplo de humildade e dedicação, o meu eterno agradecimento.

**À querida amiga MSc.** Lídia Maria Pinto de Lima, pelo exemplo de sinceridade, compromisso e ética no serviço à sociedade. Obrigada pelo carinho com que me acolheu no LACEN, pela agradável companhia, pelos conselhos e ensinamentos e também pela atenção dedicada ao meu projeto.

**Aos meus pais e irmãos**, por serem a minha base, o meu referencial, pelo amor incondicional, pelo respeito e cuidado, e por sempre acreditarem em mim, me apoiando e incentivando em cada acontecimento da minha vida, mesmo quando para isso eu precisei ficar distante.

**Ao Roger**, pelo imenso apoio e carinho e por sempre me encorajar a seguir em frente. Obrigada por abdicar das suas noites de sono, me ajudando a montar aqueles temíveis seminários! Sem você nada disso seria possível.

**À família Balthazar**, por sempre me incentivar a buscar novos conhecimentos, pelo carinho, compreensão e apoio permanente.

**Aos amigos do LACEN**, agradeço pela amizade, atenção e apoio que recebi ao longo do curso para realizar todas as atividades no laboratório.

**Aos colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB**, agradeço pela cooperatividade nas nossas atividades de rotina, pela troca de conhecimentos e ensinamentos e também pelos momentos de descontração.

**Aos meus queridos amigos de infância, de colégio, de faculdade e de trabalho**, o meu eterno agradecimento por fazerem parte da minha vida, tornando o meu dia-a-dia sempre agradável e divertido! Muitíssimo obrigada pela força, incentivo, cooperação e por compreenderem as minhas constantes ausências (que foram muitas!).

**Aos professores da pós-graduação e convidados**, a minha sincera gratidão pela dedicação, pelo desprendimento em compartilharem seus conhecimentos durante esta caminhada.

A todos **aqueles que partiram e deixaram saudades**. Acredito que o reencontro é apenas uma questão de tempo...

**Ao CNPq**, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

**Ao Departamento de Patologia Molecular da UnB**, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Enfim, a todas as pessoas que tornaram este projeto possível e que sempre torceram por mim, o meu mais profundo e sincero agradecimento.

**“Não importa o tamanho da montanha, ela não pode tapar o sol.”**

**(Provérbio Chinês)**

**"A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e força podem falhar, mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre."**

**(Louis L.Amour)**

## RESUMO

A doença diarréica aguda, ou gastroenterite aguda, representa um grande problema de saúde pública no mundo, afetando mais de 1 bilhão de crianças e adultos a cada ano. A mortalidade associada a essa síndrome é estimada em 6 milhões de casos por ano. A etiologia das gastroenterites é bastante diversa, incluindo bactérias, parasitas e vírus. Os patógenos virais são os agentes mais comumente associados a essa patologia. Dentre os agentes virais, destacam-se os norovírus, considerados atualmente, os principais agentes causais de epidemias de gastroenterites virais no mundo. O gênero *Norovirus* é constituído por 5 genogrupos (GI, GII, GIII, GIV e GV), sendo o GII o que apresenta maior prevalência em humanos. Dentro deste genogrupo, destaca-se o genótipo 4 (GII/4), por ser o principal causador de gastroenterites em humanos. Recentes trabalhos indicam novas variantes de GII/4 disseminadas pelo mundo. Este trabalho teve como objetivo estudar a variação gênica de norovírus GII que ocorreu no Distrito Federal no período entre 2006-2008. Inicialmente, os isolados do DF foram detectados por meio de tiras imunocromatográficas, utilizando um total de 182 amostras diarréicas cujos resultados para a presença de bactérias patogênicas, rotavírus e adenovírus foram negativos. A região N terminal do gene que codifica para a proteína do capsídeo foi amplificada por RT-PCR e sequenciada. A análise filogenética dos 17 norovírus isolados juntamente com sequências referências mostrou que 16 isolados pertencem ao GII/4 e um ao GII/3. Uma amostra de GII/4 foi selecionada para sequenciamento de aproximadamente metade do genoma a partir da região 3'. A análise filogenética do gene que codifica para o capsídeo, de cerca de 1.5 kb, indicou que a estirpe brasileira pertence ao subtipo "2004" ou variante Hunter. Os dados mostraram a utilidade da tira imunocromatográfica para detecção dos norovírus e genótipo dos 17 isolados no Distrito Federal. Para subtipagem, mais estudos são necessários para elucidar a minuciosa circulação de NoV GII/4 no Brasil em relação com a disseminação global.

Palavras Chaves: Gastroenterite aguda, GII/4, capsídeo, VP1.

## ABSTRACT

Acute diarrhea or acute gastroenteritis is a major problem in public health worldwide, affecting more than 1 billion of children and adults per year. The mortality associated with this syndrome is estimated to be 6 million cases a year. The etiology of gastroenteritis is diverse including bacteria, parasites and virus. Viruses are the most common casual agents for this syndrome. Among viruses, nowadays, norovirus is considered the major causative pathogen of epidemics gastroenteritis in the world. A *Norwalk virus* (Norovirus), the monotypic species of genus *Norovirus* consisted of 5 genotypes (GI, GII, GIII, GIV and GV), and GII is the most prevalent genotype in humans. Within genogroup II, genotype 4 (GII/4) is the major causative agent in the world. Recent works showed that new variants of GII/4 disseminate worldwide. This study is aimed to molecularly-characterize the norovirus GII isolated in the Federal District during years from 2006 to 2008. At first, norovirus isolates were identified by immunochromatographic strips using a total of 182 diarrheic samples which were negative for bacteria, Rotavirus and Adenovirus. The capsid gene region of N-terminal capsid protein was amplified by RT-PCR and sequenced. Phylogenetic analysis of 17 norovirus isolates with reference sequences showed that 16 isolates belonged to GII/4 and one to GII/3. One GII/4 isolate was selected to be sequenced almost half of its genome at 3' region. Phylogenetic analysis of whole capsid gene of 1.5 kb showed that this Brazilian isolate belonged to subtype "2004" or Hunter variant. Our results showed that the usefulness of immunochromatographic stripe for norovirus detection and genotype of 17 noroviruses isolated in the Federal District. For subtyping, further study will be necessary to elucidate the detailed circulation of norovirus GII/4 in Brazil in relation to the global dissemination.

Keywords: Acute gastroenteritis, GII/4, capsid, VP1

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Árvore filogenética baseada na sequência completa de aminoácidos do gene que codifica para a proteína do capsídeo dos norovírus. Genogrupos: GI, GII, GIII, GIV e GV. Os números nas caixas indicam os genótipos (Zheng *et al.*, 2006). ..... **16**
- Figura 2** - Principais vias de transmissão dos Norovírus (Adaptado de Moreno-Espinosa *et al.*, 2004). ..... **17**
- Figura 3** - Fonte: Hardy, (2005); Donaldson *et al.*, (2010). Organização genômica dos norovírus na direção 5'→3'. VPg: proteína ligada ao genoma. ORF 1 codifica uma poliproteína que é clivada em seis proteínas não-estruturais: p48, NTP, p22, VPG, 3C e RdRp. ORF 2 codifica a maior proteína estrutural do capsídeo (VP1). VP1 está dividida em dois domínios: domínio S (amarelo) e domínio P, que apresenta dois subdomínios, P1 (azul) e P2 (vermelho). A ORF 3 codifica a menor proteína estrutural do capsídeo (VP2). Extremidade poliadenilada na região 3'. ..... **19**
- Figura 4** - Kit de imunocromatografia rápida (IP-Noro Immuno-Probe, Co. Ltd.)..... **23**
- Figura 5** - Resultado de tira de imunocromatografia com amostras fecais. (A): Amostra não reagente. Visualização da linha de controle para validação do teste. (B): Amostra reagente para NoV GII/3 ou GII/4 com linhas positivas de controle e de norovírus. .... **23**
- Figura 6** - Percentual de amostras fecais positivas para detecção de Norovírus GII/3 ou GII/4 de um total de 182 amostras analisadas. .... **31**
- Figura 7** - Amostra representativa de norovírus: canaleta 1, produto de PCR (343 bp) observado em gel de eletroforese; 1Kb – padrão de peso molecular; canaletas 2 a 5: amostras não reagentes..... **32**
- Figura 8**- Análise filogenética das amostras de norovírus baseada na sequência de nucleotídeos da região do capsídeo. Os isolados do Distrito Federal, denominados como BR-DF mais numeração, encontram-se indicados por quadro ou agrupamento. .... **34**
- Figura 9** - Análise filogenética para subtipagem da amostra de Norovírus GII/4 baseada na sequência de nucleotídeos da ORF 2 (gene do capsídeo). O isolado BR-DF 17 está indicado no quadro em vermelho. Referências dos subtipos retiradas do artigo publicado por Motomura *et. al* (2010) em ordem: nome da referência, nº de acesso e nome do subtipo. Referências dos subtipos retiradas do artigo publicado por Pang *et. al* (2010) em ordem: nome do subtipo e nº de acesso. As discrepâncias entre os dois artigos encontram-se marcadas nas cores azul e amarelo. .... **35**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aa	aminoácidos
DDA	doença diarréica aguda
dNTP	desoxi-nucleotídeo trifosfatado
DTT	dithiothreitol
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-thiogalactopiranosidase
LACEN-DF	Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal
LB	Luria Broth
MAb	anticorpo monoclonal
ME	microscopia eletrônica
MMLV	MoloneyMurine Leukemia Virus
NTP	proteína nucleosídeo trifosfatase
NoVs	norovírus
ORF	região de leitura aberta
PBS	tampão fostafo-salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
p20	proteína 20
p22	proteína 22
p48	proteína 48
q.s.p	quantidade suficiente para

RdRp	RNA polimerase RNA dependente
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotação por minuto
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with catabolite repression</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris- Borato-EDTA
VPg	proteína ligada ao genoma
3C	protease
°C	grau Celsius
g	grama
mg	miligrama
µg	micrograma
mL	mililitro
µL	microlitro
mM	milimolar
µM	micromolar
Kb	kilobase
kDa	kilodalton
Kv	kilovolt
V	volt

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 Gastroenterite .....	14
1.2 Os Norovírus .....	15
1.2.1 Classificação .....	15
1.2.2 Epidemiologia .....	17
1.2.3 Estrutura morfológica, genoma e proteínas virais .....	18
1.2.4 Diagnóstico laboratorial .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 Objetivo geral .....	21
2.2. Objetivos específicos .....	21
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1 Seleção das amostras .....	22
3.2 Teste de imunocromatografia rápida - IP Noro .....	22
3.3 Suspensão fecal para extração de RNA .....	24
3.4 Extração de RNA viral .....	24
3.5 Reação de Transcrição reversa para obtenção de cDNA .....	25
3.6 Reação em Cadeia da Polimerase para obtenção do <i>amplicon</i> .....	25
3.7 Análise dos amplicons por eletroforese em gel de agarose a 1,0% .....	26
3.8 Sequenciamento parcial do genoma viral .....	26
3.9 Análise filogenética das sequências .....	27
3.10 RT-PCR para seqüenciamento da região 3' do genoma do NoV .....	27

3.11	Adição de “A-overhang” em fragmentos de cDNA amplificados por PCR .....	28
3.12	Purificação do DNA .....	28
3.13	Ligação em vetor de clonagem pCR4-TOPO .....	28
3.14	Transformação bacteriana .....	29
3.15	Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep) e seleção de clones .....	29
3.16	Sequenciamento parcial do genoma (região 3' do genoma) .....	29
3.17	Análise do estudo filogenético e subgenotipagem .....	30
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
4.1	Teste de imunocromatografia rápida para detecção de NoV GII3 e GII4 .....	31
4.2	Análise de RT-PCR .....	32
4.3	Resultado da árvore filogenética (genotipagem e subgenotipagem) .....	33
4.4	Árvore filogenética do isolado BR-DF17 .....	35
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>39</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>40</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Gastroentite

A gastroenterite aguda, ou doença diarréica aguda (DDA) é uma síndrome cuja manifestação predominante é o aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou de pouca consistência, podendo ser acompanhada de náusea, vômito, febre e dor abdominal. Em alguns casos, há presença de muco e sangue nas fezes. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Esta síndrome é o maior problema de saúde pública no mundo, afetando mais de 700 milhões de crianças menores de 5 anos a cada ano (CASTILHO *et al.*, 2006). De acordo com Morillo e colaboradores (2008), há uma estimativa de que mais de 1 bilhão de crianças e adultos sejam acometidos pela DDA anualmente, sendo a mortalidade associada às gastroenterites estimada em 6 milhões de casos por ano. A doença figura como a terceira causa mais comum de morbidade em crianças dos países em desenvolvimento e é responsável por cerca de um terço de todas as hospitalizações entre os menores de cinco anos (PEREIRA; CABRAL, 2008). No Brasil, a doença diarréica acomete principalmente a população residente nas periferias urbanas e nas áreas rurais das regiões Norte e Nordeste (ORLANDI *et al.*, 2001). De acordo com o Manual de Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas (2002), mais de 600 mil internações por ano ocorrem no Brasil devido à doença infecciosa intestinal, causando quase 8 mil mortes, o que representa um importante prejuízo à saúde da população e uma perda econômica significativa para o país. No Distrito Federal, segundo Gomes e colaboradores. (2005) em relatório divulgado pela Secretaria do Estado de Saúde do DF, a diarreia aparece como a principal causa de óbito entre as doenças infecciosas e parasitárias em menores de 1 ano, entre 1999 e 2002. A etiologia das gastroenterites é bastante diversa, incluindo bactérias, parasitas e vírus (FERNÁNDEZ & GÓMEZ, 2010). Os patógenos virais são os agentes mais comumente associados a casos de gastroenterites em comunidades e em outros setores, como hospitais e instituições semifechadas (XAVIER, *et.al*, 2009). Os agentes etiológicos virais mais comumente

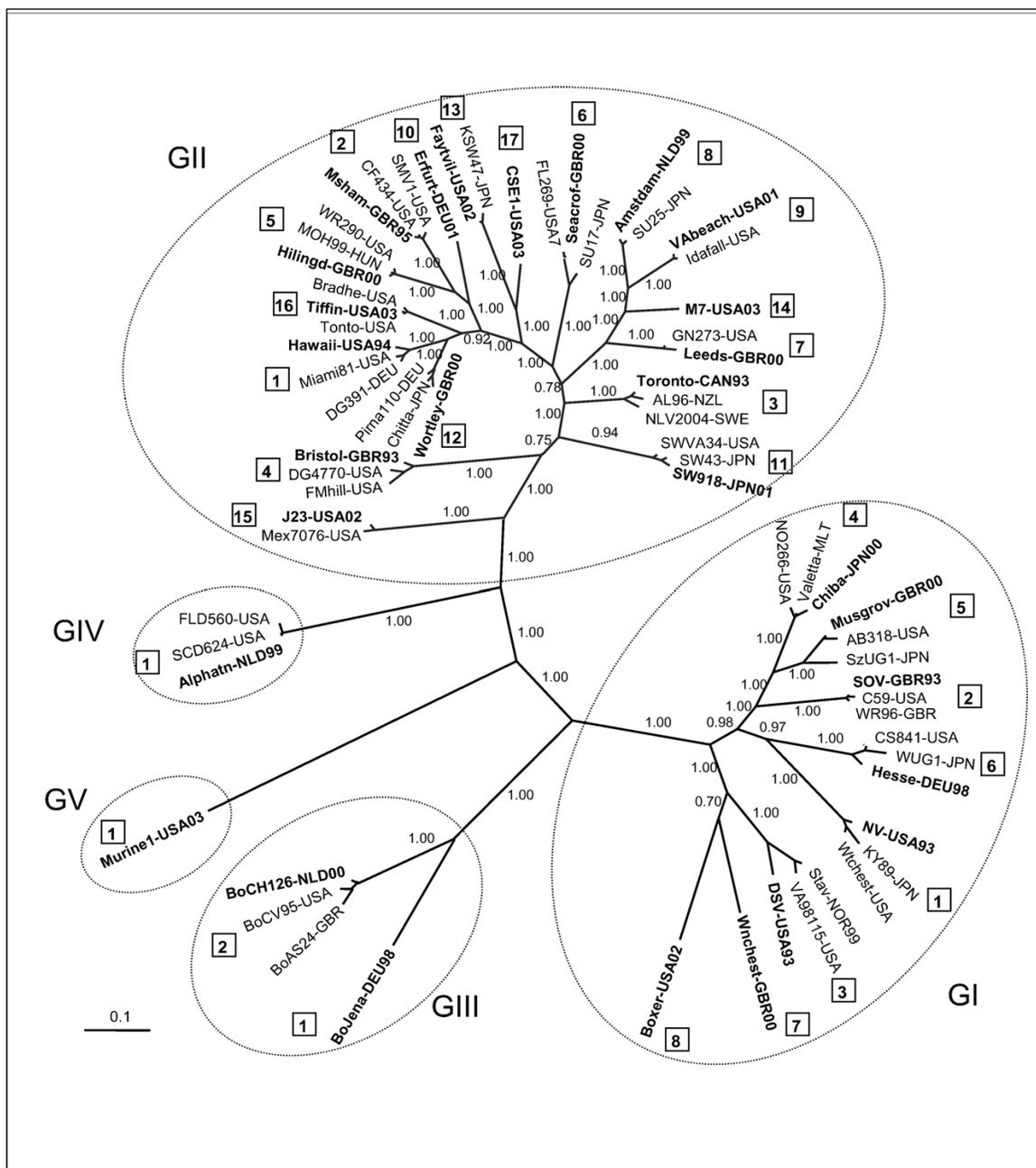
associados a essas enfermidades são os rotavírus, adenovírus, norovírus, sapovírus e astrovírus (KHAMRIN *et al.*, 2009; LOPMAN *et al.*, 2003). Recentemente, os norovírus (NoVs) têm sido considerados os principais agentes causais de epidemias de gastroenterites virais em todos os grupos etários (KITIGUL *et al.*, 2010), sendo responsáveis por mais de 1,1 milhões de hospitalizações e 218.000 mortes infantis/ano nos países em desenvolvimento (VICTORIA *et al.*, 2009). Desde 2000 são relatadas epidemias de norovírus no mundo, como nos EUA (GREEN *et al.*, 2000), na Europa (SIEBENGA *et al.*, 2007a), Austrália (BULL *et al.*, 2006) e Ásia (OZAWA *et al.* 2007).

## 1.2 Os Norovírus

### 1.2.1. Classificação

Esses vírus pertencem ao gênero *Norovirus* que, juntamente com os gêneros *Sapovirus*, *Lagovirus* e *Vesivirus*, formam a família *Caliciviridae* (SIEBENGA *et al.*, 2007; GALLIMORE *et al.*, 2004).

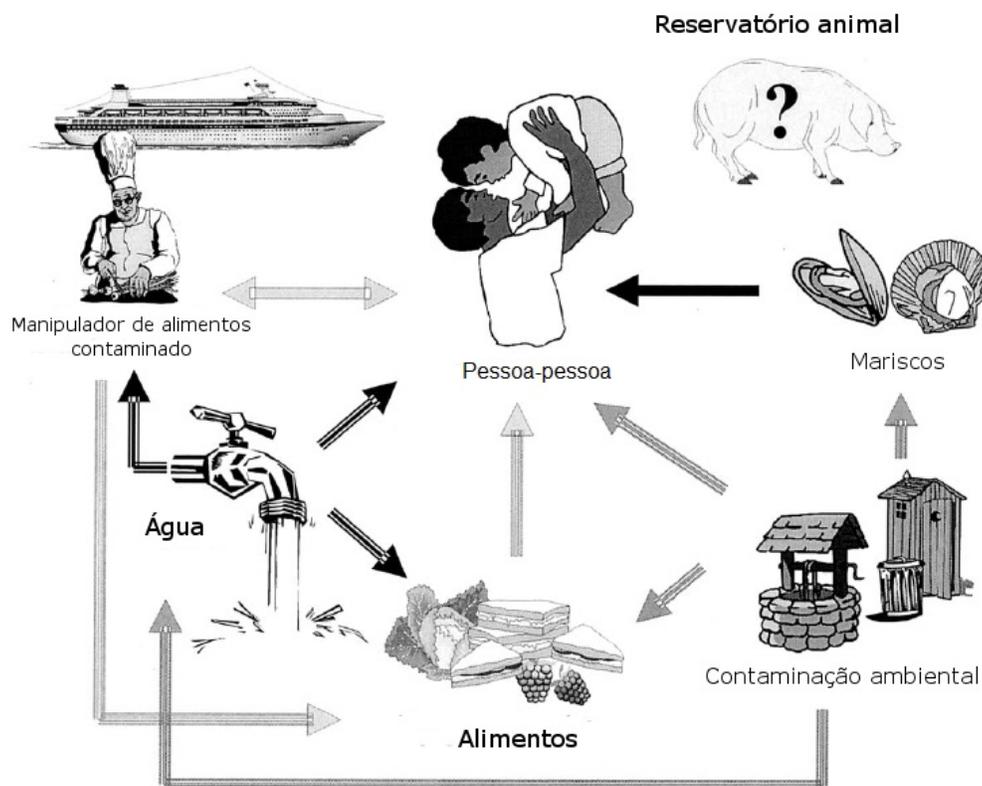
O gênero *Norovirus*, é formado por 5 genogrupos (GI, GII, GIII, GIV e GV), sendo que GI, GII e GIV estão associados à gastroenterite humana, enquanto GIII e GV estão associados às infecções em bovinos e murinos, respectivamente. De acordo com a análise do seqüenciamento completo de aminoácidos do gene que codifica para a proteína do capsídeo, os genogrupos contém um total de 29 genótipos (8 em GI, 17 em GII, 2 em GIII, 1 em GIV e 1 em GV) (ZHENG *et al.*, 2006) (Figura 1).



**Figura 1** - Árvore filogenética baseada na sequência completa de aminoácidos do gene que codifica para a proteína do capsídeo dos norovírus. Genogrupos: GI, GII, GIII, GIV e GV. Os números nas caixas indicam os genótipos (Zheng *et al.*, 2006).

### 1.2.2. Epidemiologia

A transmissão dos NoVs ocorre por via fecal-oral, predominantemente através da ingestão de água ou alimentos contaminados, por contato pessoa-pessoa e por contato com aerossóis e superfícies contaminadas (MORENO-ESPINOSA *et al.*, 2004; CAMPOS *et al.*, 2008) (Figura 2). Estão frequentemente associados a surtos em hospitais, cruzeiros, escolas, universidades, residências e restaurantes e os surtos causados por esse agentes espalham-se rapidamente causando um grande impacto econômico na sociedade devido aos gastos com medicamentos e internações (BULL *et al.*, 2010; TSENG *et al.*, 2010). O controle da disseminação de norovírus complica-se pela alta infectividade desses vírus, que têm em média 18 partículas virais por dose infecciosa. Além disso, podem persistir no ambiente durante semanas e é resistente a muitos desinfetantes (KIRKING *et al.*, 2010).



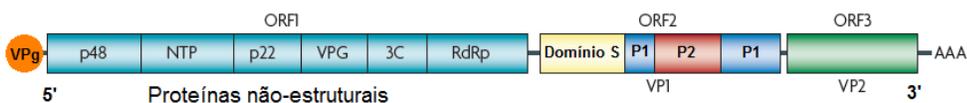
**Figura 2** - Principais vias de transmissão dos Norovírus (Adaptado de Moreno-Espinosa *et al.*, 2004)

Dentre os cinco genogrupos, o GII é o que apresenta maior significância clínica, já que apresenta maior prevalência em humanos, além de estar mais frequentemente associado com epidemias quando comparado com outros genogrupos. O NoV GII/4 (genogrupo II, genótipo 4) é o principal causador de gastroenterites em humanos, sendo responsável por 62% de todos os surtos de norovírus no mundo (SIEBENGA *et al.*, 2009, SIEBENGA *et al.*, 2007). Tem sido relatado como o genótipo predominante ao longo das duas últimas décadas, estando associado a epidemias nos anos de 1996, 2002, 2004, 2006 e 2008. Em cada ano, pelo menos uma nova variante de GII.4 foi identificada (ZHENG *et al.*, 2010; CANNON *et al.*, 2009; PANG *et al.*, 2010). A distribuição global de distintas estirpes de GII.4 foi primeiramente identificada em 1995 e 1996 (NOEL *et al.*, 1999). Entre 1997 e 2001, os NoVs apresentaram atividade moderada a baixa, sendo responsáveis por aproximadamente 10 a 29 % de todos os surtos de gastroenterites ocasionados pelo vírus (CANNON *et al.*, 2009). Após 2002, variantes de GII/4 emergiram rapidamente, causando epidemias a cada 1 ou 2 anos (SIEBENGA *et al.*, 2007a; DONALDSON *et al.*, 2008; LINDESMITH *et al.*, 2008).

### **1.2.3. Estrutura morfológica, genoma e proteínas virais**

Os membros do gênero Norovirus são vírus pequenos cujo diâmetro varia entre 27 a 40 nm. Apresenta formato arredondado, simetria icosaédrica e capsídeo não envelopado. (ATMAR & ESTES, 2001). O genoma dos norovírus é constituído de RNA fita simples, linear, com polaridade positiva, poliadenilada na extremidade 3' e de aproximadamente 7,5 kb de tamanho (XI *et al.*, 1990). Apresenta, na extremidade 5', uma proteína ligada covalentemente, denominada Proteína ligada ao genoma (VPg), seguida de três regiões de leitura aberta (ORF). A ORF 1 codifica uma poliproteína que é clivada pela protease viral em proteínas não-estruturais como a p48, NTPase, p20 (GI) ou p22 (GII), VPg; proteinase e RNA polimerase RNA dependente (RpRd) (ALLEN *et al.*, 2008; BELLLOT *et al.*, 2005). ORF 2 e ORF 3

codificam a maior (VP1) e menor (VP2) proteína estrutural do capsídeo, respectivamente (BERTOLOTTI-CIARLET *et al.*, 2003) (Figura 3).



**Figura 3:** Fonte: Hardy,(2005); Donaldson *et al.*, (2010). Organização genômica dos norovírus na direção 5'→3'. VPg: proteína ligada ao genoma. ORF 1 codifica uma poliproteína que é clivada em seis proteínas não-estruturais: p48, NTP, p22, VPG, 3C e RdRp. ORF 2 codifica a maior proteína estrutural do capsídeo (VP1). VP1 está dividida em dois domínios: domínio S (amarelo) e domínio P, que apresenta dois subdomínios, P1 (azul) e P2 (vermelho). A ORF 3 codifica a menor proteína estrutural do capsídeo (VP2). Extremidade poliadenilada na região 3'.

A proteína VP1 é constituída de 530 a 555 aa, apresentando massa molecular de aproximadamente 58 a 60 kDa (HARDY, 2005). Está organizada em dois domínios principais: S e P. O domínio S forma a parte interna do capsídeo que envolve o genoma viral (GREEN, 2007; ATMAS & ESTES, 2001) e é constituído por 225 aminoácidos (aa) no extremo N-terminal, que contém elementos essenciais para a formação do icosaedro. O domínio P, subdividido em domínios P1 e P2, compreende os demais aa do extremo C-terminal. Este domínio interage em contatos diméricos aumentando a estabilidade do capsídeo e formando as protrusões no vírion. O domínio P2, constituído por 127 aa, está inserido no domínio P1 e apresenta uma região hipervariável com papel importante na união ao receptor celular e na imunogenicidade (HARDY, 2005).

A proteína VP2 é constituída de 208-268 aa, apresentando massa molecular de aproximadamente 22 a 29 kDa. Exibe alta variabilidade na sequência entre diferentes genótipos (HARDY, 2005).

#### 1.2.4. Diagnóstico laboratorial

Os norovírus foram detectados pela primeira vez através da microscopia eletrônica (ME) (KAPIKIAN *et al.*, 1972). Esta metodologia apresenta limitação em razão da baixa sensibilidade, o que exige altas concentrações de vírus ( $10^5$ -  $10^6$  partículas/mL) para visualização (KOOPMANS *et al.*, 2002). Nesse contexto, a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa - RT-PCR - é o ensaio diagnóstico mais eficaz na detecção viral, já que é capaz de detectar até 100 partículas virais/mL, mesmo após a resolução da infecção aguda. Além disso, permite a detecção viral em amostras fecais estocadas a 4°C durante meses ou a -70°C por mais de 10 anos (ATMAS & ESTES, 2001; TATSUMI *et al.*, 2002).

O imunoensaio é uma alternativa rápida e barata e de simples execução para detecção de norovírus em amostras fecais. Contém no interior da fita-teste anticorpos anti-norovírus (GII/3 e GII/4), sendo incapazes de detectar todos os genótipos de GII. Embora seja menos sensível que o RT-PCR, pode ser uma ferramenta essencial para prevenção da disseminação viral na população em casos de surtos (BULL *et al.*, 2006; THONGPRACHUM, *et al.*, 2010)

Têm-se utilizado diferentes iniciadores em distintas regiões do genoma viral para detecção de NoV, tais como a região da RdRp, a região da junção ORF1-ORF 2, além da região N-terminal da proteína do capsídeo (KOBAYASHI *et al.*, 2000; KAGEYAMA *et al.*, 2004; GALLIMORE *et al.*, 2004).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Estudar a variação gênica de norovírus genogrupo II que ocorreu no Distrito Federal nos anos de 2006, 2007 e 2008.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Identificar norovírus genogrupo II por teste rápido de imunocromatografia-IP Noro (Imuno Probe Co. Ltd., Japan);
- Amplificar por RT-PCR o DNA complementar (cDNA) das amostras de norovírus genogrupo II positivas no teste de imunocromatografia e genotipar esses isolados por sequenciamento direto do produto de PCR ou da clonagem molecular;
- Selecionar pelo menos 1 isolado e clonar cDNA do genoma a partir da região 3' em vetor plasmidial para analisar subtipagem do GII/4 e possível recombinação do isolado.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

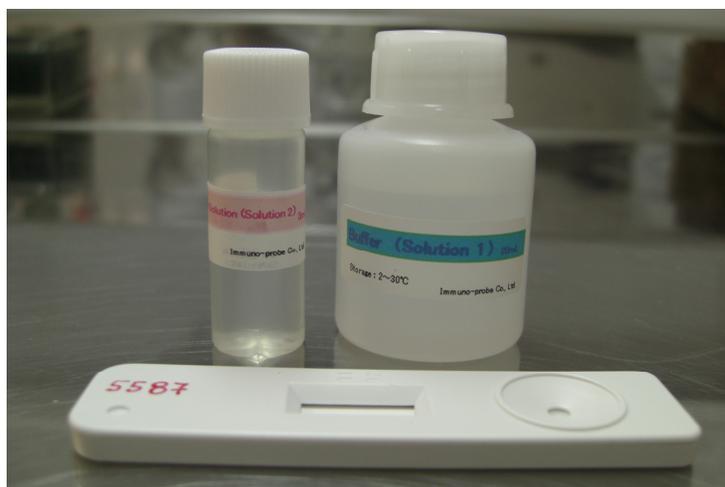
#### **3.1. Seleção das amostras**

Mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, nº 093/09, foram selecionadas amostras fecais coletadas entre os anos de 2006 e 2008 no Distrito Federal, que estavam armazenadas no freezer a -80°C. Inicialmente, realizou-se uma triagem em que o critério de exclusão utilizado foi a presença de rotavírus e/ou bactérias patogênicas detectados pelos métodos de ELISA e coprocultura, respectivamente, resultando num total de 182 amostras selecionadas (Dessas, 80 foram coletadas em 2006, 86 em 2007 e 16 em 2008).

#### **3.2. Teste de imunocromatografia rápida - IP Noro**

O teste de imunocromatografia rápida (IP-Noro; Immuno-Probe, Co. Ltd., Saitama, Japão) é de simples execução e permite a rápida detecção de norovírus GII/3 e GII/4 (Figura 4). A tira-teste é formada por uma membrana de nitrocelulose com um anticorpo monoclonal anti-norovírus GII/4 de ratos (MAb 14-1) conjugado com colóide de ouro que apresenta reatividade cruzada com diversos outros genótipos. Apresenta uma linha teste com anticorpos policlonais contra NoV GII/3 e GII/4 e uma linha controle com anticorpos anti-imunoglobulina de ratos (KHAMRIN *et al.* 2008). A ligação do antígeno com o anticorpo anti-norovírus e a posterior ligação desse complexo com o conjugado permitem a detecção do vírus por meio da visualização de uma linha violeta na fita reagente e outra linha reagente (fita controle) indicando a validação da reação. A ausência de norovírus pode ser observada pelo surgimento de apenas 1 banda (fita controle) (Figura 5).

Para detecção de norovírus GII/3 ou GII/4, as amostras fecais foram submetidas ao teste rápido, IP Noro, conforme instruções do fabricante (Imuno Probe Co. Ltd., Japan). Cada 0,1g de amostra fecal foi diluído em 1 mL de tampão (Solution 1). A suspensão foi agitada em vortex, por 5 segundos, e centrifugada por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 40 µL de solução de pré-tratamento (Solution 2) em 160 µL do sobrenadante da suspensão. A mistura foi homogeneizada em vortex por 5 segundos e, em seguida, aplicada (100 µL) na tira-teste. Aguardou-se 15 minutos para leitura do resultado.



**Figura 4** - Kit de imunocromatografia rápida (IP-Noro Immuno-Probe, Co. Ltd.)



**Figura 5** - Resultado de tira de imunocromatografia com amostras fecais. (A): Amostra não reagente. Visualização da linha de controle para validação do teste. (B): Amostra reagente para NoV GII/3 ou GII/4 com linhas positivas de controle e de norovírus.

### 3.3. Suspensão fecal para extração de RNA

As amostras fecais armazenadas no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  foram descongeladas e diluídas a 20% em tampão PBS, pH 7,4 (NaCl 8,0g; KCL 0,2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  2,89g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2g e  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p 1000 mL, pH ajustado com HCL), homogeneizadas em agitador de tubos Vortex e clarificadas por centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos (PEREIRA *et al.*, 1983).

### 3.4. Extração de RNA viral

O RNA total foi extraído com “Trizol LS reagent” (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Estocou-se o material em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  em solução de etanol à 70% até o momento da reação de transcrição reversa.

### 3.5. Reação de Transcrição reversa para obtenção de cDNA

A síntese do cDNA a partir do RNA extraído foi realizada utilizando-se *primer* G2SKR (*reverse*; 5'-CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT-3', nt 5401-5423) que foi desenhado com base na região N terminal do capsídeo (KOJIMA *et. al.*, 2002).

A mistura de reagentes para a transcrição reversa composta de 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (Fermentas) 10 mM, 1  $\mu\text{L}$  de primer G2SKR 50  $\mu\text{M}$  e 6  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  livre de RNase foi adicionada a 5  $\mu\text{L}$  de RNA extraído e incubada a  $75^{\circ}\text{C}$ , durante 5 minutos. Em seguida, foi imediatamente colocada em banho de gelo e após a adição de 4  $\mu\text{L}$  de tampão 5x, 2  $\mu\text{L}$  de DTT 0.1M e 1  $\mu\text{L}$  de MMLV (200U/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen), foi incubada a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 1 hora. Estocou-se o produto em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da PCR.

### 3.6. Reação em Cadeia da Polimerase para obtenção do *amplicon*

Para a PCR foram adicionados 2 µL do produto da reação de transcriptase reversa (cDNA) a 23 µL da mistura de reagentes composta por 2,5 µL de tampão 10X, 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 2,0 µL de dNTP 2,5 mM, 0,5 µL de *primer* (10µM) G2SKF (*forward*; 5'-CNT GGG AGG GCG ATC GCA A-3', nt 5058-5076), 0,5 µL de *primer* (10µM) G2SKR (*reverse*; 5'-CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT-3', nt 5401-5423), 16,25 µL de H<sub>2</sub>O livre de RNAse e 0,25 µL de *Taq DNA polymerase* (5U/L) (Invitrogen). A solução foi então colocada no termociclador a 80°C durante 30 segundos (*hot start*) e, posteriormente, submetida a uma etapa de desnaturação a 94°C por 3 minutos. Em seguida foram realizados 35 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguida de uma etapa final de alongação de 7 minutos.

### 3.7. Análise dos amplicons por eletroforese em gel de agarose a 1,0%

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese (100V por 30 minutos) em gel de agarose a 1,0% (Invitrogen) em tampão TBE 0,5X (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Cinco microlitros do produto da reação e 2 µL do corante azul de bromofenol foram aplicados em cada orifício do gel. Após submersão do gel por 20 minutos em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL, os *amplicons* foram visualizados através do transiluminador de ultravioleta.

### 3.8. Sequenciamento parcial do genoma viral

Os produtos da PCR submetidos ao sequenciamento foram inicialmente purificados com a utilização de duas enzimas - Exonuclease I (Fermentas) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (Fermentas) - seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, com modificação. A primeira enzima tem por finalidade degradar o excesso de DNA fita simples (*primers*) enquanto a outra retira nucleosídeos trifosfatos (dNTPs) que não foram incorporados durante a PCR. Foram adicionados 1 µL de *Shrimp Alkaline Phosphatase* e 0,5 µL de Exonuclease I aos 6 µL da solução de PCR. A solução foi incubada a 37°C por 15 minutos e, em seguida, incubada a 85°C por mais 15 minutos para desnaturar as enzimas.

Para sequenciamento dos produtos de PCR purificados foi utilizado o kit comercial “Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied BioSystem, CA, USA), 1,5 µL de *primer* G2SKF (2,0 µM) e quantidade necessária de H<sub>2</sub>O milli-Q para completar um total de 8 µL de reação.

Utilizou-se o sequenciador automático Applied BioSystem 377 para obtenção dos eletrocromatogramas.

### 3.9. Análise filogenética das sequências

Após o alinhamento múltiplo feito por Clustal W embutido no MEGA5 as extremidade de alinhamento foram uniformizadas (*trimming*) e a árvore filogenética foi construída a partir do algoritmo “Maximum likelihood”, baseada no modelo “Tamura-Nei”, com 500 replicações de bootstrap, utilizando-se o software MEGA 5.

### 3.10. RT-PCR para sequenciamento da região 3' do genoma do NoV

Após análise do sequenciamento, selecionou-se uma amostra de NoV GII/4 para sequenciamento da região 3' do seu genoma. A reação de transcrição reversa para obtenção do cDNA foi realizada a partir mistura de 10,0 µL de RNA extraído, 1,0 µL de *primer* oligo-dT50M4 (5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACT TAA TTA A (T)15) (50 µM) e 1,0 µL de dNTP (10 mM). Após incubação da solução a 75°C, por 5 minutos, adicionou-se 4,0 µL de tampão, 2,0 µL de DTT 0,1M, 1,0 µL de RNase OUT (Invitrogen) e 1,0 µL de Superscript III (200U/µL) (Invitrogen) e incubou-se a 45°C por 1 hora. Em seguida a solução foi incubada a 75°C por 15 minutos e, após esse período, adicionou-se 1,0 µL de RNase H. Incubou-se a 37°C por 20 minutos. Estocou-se o produto em freezer -20°C até o momento da PCR. Para a reação em cadeia da polimerase, 1,0 µL do cDNA foi misturado a 5,0 µL de tampão 5X, 4,0 µL de dNTP (2,5 mM), 1,0 µL de *primer* M4(10µM 5'- GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'), 1,0 µL de *primer* Noro II3'For (5'- GGA AAA ACG ACT GCT GGA ACG G -3'), 12,0 µL de H<sub>2</sub>O livre de RNase e 1,0 µL de *Long Amp Taq DNA Polymerase* (2,5U/µL) (New England BioLabs). A solução foi então colocada no termociclador a 80°C durante 60 segundos (*hot start*) e após, submetida a uma etapa de desnaturação a 94°C por 2 minutos. Em seguida foram realizados 35 ciclos de amplificação de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 65°C por 4 minutos e 30 segundos, seguida de uma etapa final de alongação de 10 minutos a 65°C.

### 3.11. Adição de “A-overhang” em fragmentos de cDNA amplificados por PCR

A enzima *Long Amp DNA polymerase* gera o fragmento de DNA com extremidades “blunt end”. A enzima Taq DNA Polimerase possui a capacidade de adicionar à região 3' do genoma a Adenosina (*A-overhang*). Para poder clonar o produto de PCR em vetor TA, 0,1 µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) foram adicionados a 25 µL da solução da PCR. A solução foi incubada a 72°C por 30

minutos. Este tratamento é realizado quando se pretende clonar o inserto em vetor plasmidial pCR4-TOPO *TA cloning Kit* (Invitrogen).

### **3.12. Purificação do DNA**

O produto da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%. Após submersão do gel por 15 minutos em solução violeta cristal (0,1%), os fragmentos de cDNA de tamanho esperado (c.a. 3.5kb) foram cortados, eluídos e purificados com kit de purificação de DNA conforme recomendações do fabricante (illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit).

### **3.13. Ligação em vetor de clonagem pCR4-TOPO**

A ligação do inserto ao vetor de clonagem pCR4-TOPO (Invitrogen) foi efetuado conforme protocolo do fabricante.

### **3.14. Transformação bacteriana**

O produto da ligação (2,0 µL) foi adicionado a 60 µL de células competentes *E.coli* DH5α previamente descongeladas. O choque foi realizado com eletroporador “Bio-Rad Gene Pulser”, a uma voltagem de 1,8 kV. Em seguida, foram adicionados 800 µL de meio SOC e a mistura foi incubada a 37°C por 1 hora, sob agitação.

Com auxílio de alça de Drigalski, 200 µL da solução de células competentes transformadas foram semeadas por disseminação em meio de cultura Luria Broth

(meio LB) sólido, com 40 µL de canamicina a 50 mg/mL e 20 µL de IPTG ( Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosidase) a 100 mg/mL, e incubados overnight, a 37°C.

### **3.15. Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep) e seleção de clones**

Foram selecionadas 6 colônias para extração do DNA plasmidial, que foi purificado utilizando-se o protocolo de miniprep, conforme protocolo estabelecido por SAMBROOK & RUSSELL (2001).

### **3.16. Sequenciamento parcial do genoma (região 3' do genoma)**

Para cada clone a ser seqüenciado, foi preparado DNA plasmidial com kit “illustra plasmidPrep Mini Spin” (GE Healthcare). O sequenciamento de clones selecionados foi feito na empresa “Macrogen”, na Coréia do Sul.

### **3.17. A análise do estudo filogenético e subgenotipagem**

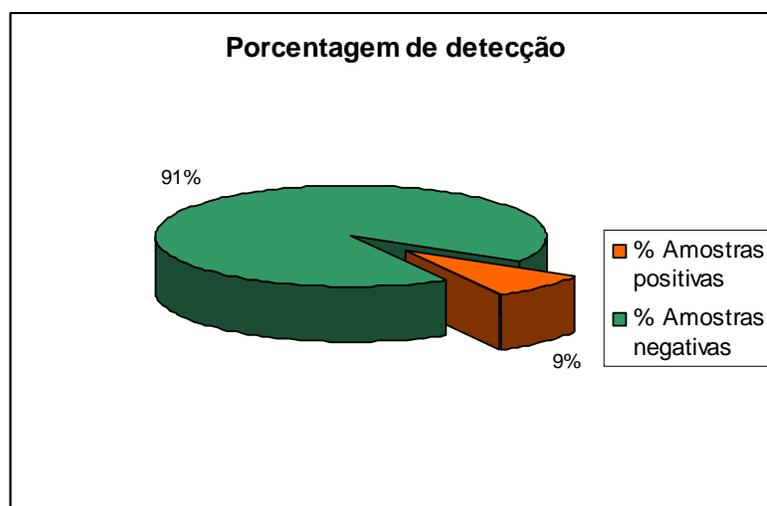
A partir do resultado do sequenciamento da extremidade 3' do genoma do NoV, foi feita uma análise filogenética com o objetivo de identificar a qual subgrupo do GII/4 a amostra pertence. Para tanto, buscou-se no banco de dados (*GenBank*, NCBI) cepas de NoV GII/4 utilizadas como referência em um trabalho realizado por

Pang e colaboradores (2010) no Canadá: AB303923 (1996), AJ004864 (1996), EU078417 (2006b), EF126966 (2006b), AB445395 (2008b), AB303933 (2002), AY502023 (2002), EF126963 (2006a), EF126964 (2006a), AY883096 (2004), DQ078794 (2004), AB434770 (2008). Foram acrescentadas a essas referências outras utilizadas em um trabalho publicado por Motomura e colaboradores (2010), no Japão: U07611 (GII/1), AB067542 (GII/3), X86557 (GII/4), AB039776 (GII/6 - Saitama\_U3/JP), AB067543 (GII/8), AY237415 (GII/10), AB039775 (GII/12 - Saitama\_U1/JP), AY587989 (2002/3 - B2S16/2002/UK), AB447448 (2004/2005 - Sakai2/2006/JP), AB447432 (2006a - Aomori1/2006/JP), AB447446 (2006b - Aichi3/2006/JP), AB541319 (2007a - Osaka1/2007/JP), AB541275 (2007b - Iwate5/2007/JP), AB541268 (2008a - Hokkaido5/2008/JP) e AB541266 (2008b - Hokkaido4/2008/JP).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Teste de imunocromatografia rápida para detecção de NoV GII/3 e GII/4

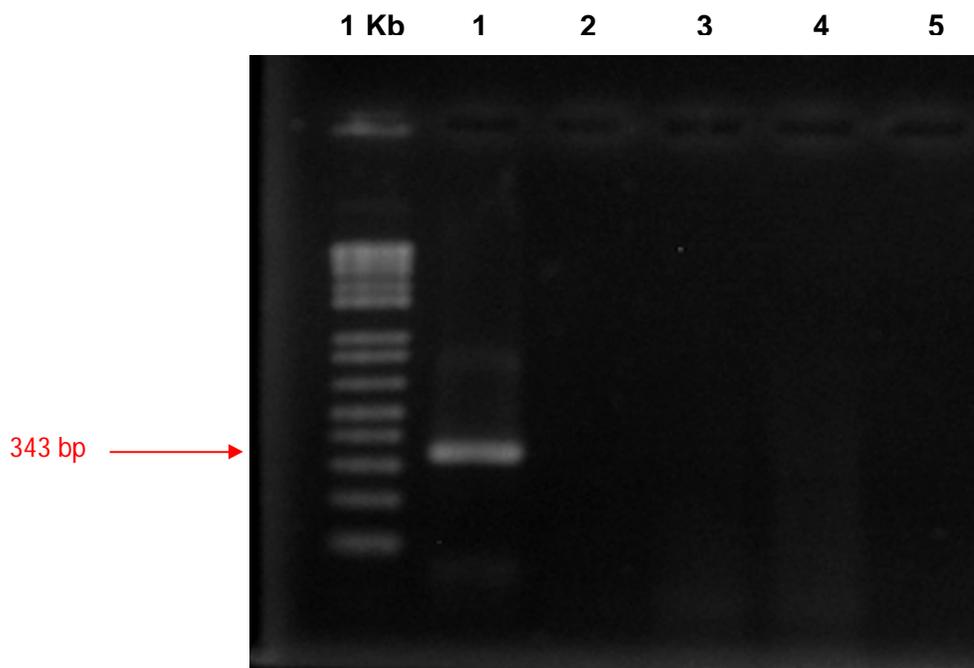
No presente estudo, de um total de 182 amostras fecais submetidas ao teste de imunocromatografia rápida, somente 17 apresentaram positividade para a presença de NoV GII (Figura 6). Das amostras positivas, 6 eram pertencentes a um surto de gastroenterite ocorrido em uma creche do Distrito Federal, no ano de 2006. Elas estão indicadas na figura 7 com as referências: BR-DF02, BR-DF03, BR-DF05, BR-DF07, BR-DF17 e BR-DF78. As outras 11 amostras eram pertencentes a casos esporádicos de gastroenterites ocorridos durante os anos de 2006 e 2007.



**Figura 6** - Percentual de amostras fecais positivas para detecção de Norovírus GII/3 ou GII/4 de um total de 182 amostras analisadas.

## 4.2. Análise de RT-PCR

As 17 amostras analisadas pelo teste de imunocromatografia rápida foram identificadas como norovírus genogrupo GII pela técnica de RT-PCR, utilizando-se o par de *primers* G2SKF (*forward*; 5'-CNT GGG AGG GCG ATC GCA A-3', nt 5058-5076) e G2SKR (*reverse*; 5'-CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT-3', nt 5401-5423). O produto de DNA de uma amostra, obtido pela amplificação da região N terminal do capsídeo ( 343 pares de bases), pode ser visualizado na figura 7.



**Figura 7** - Amostra representativa de norovírus: canaleta 1, produto de PCR (343 bp) observado em gel de eletroforese; 1Kb – padrão de peso molecular; canaletas 2 a 5: amostras não reagentes.

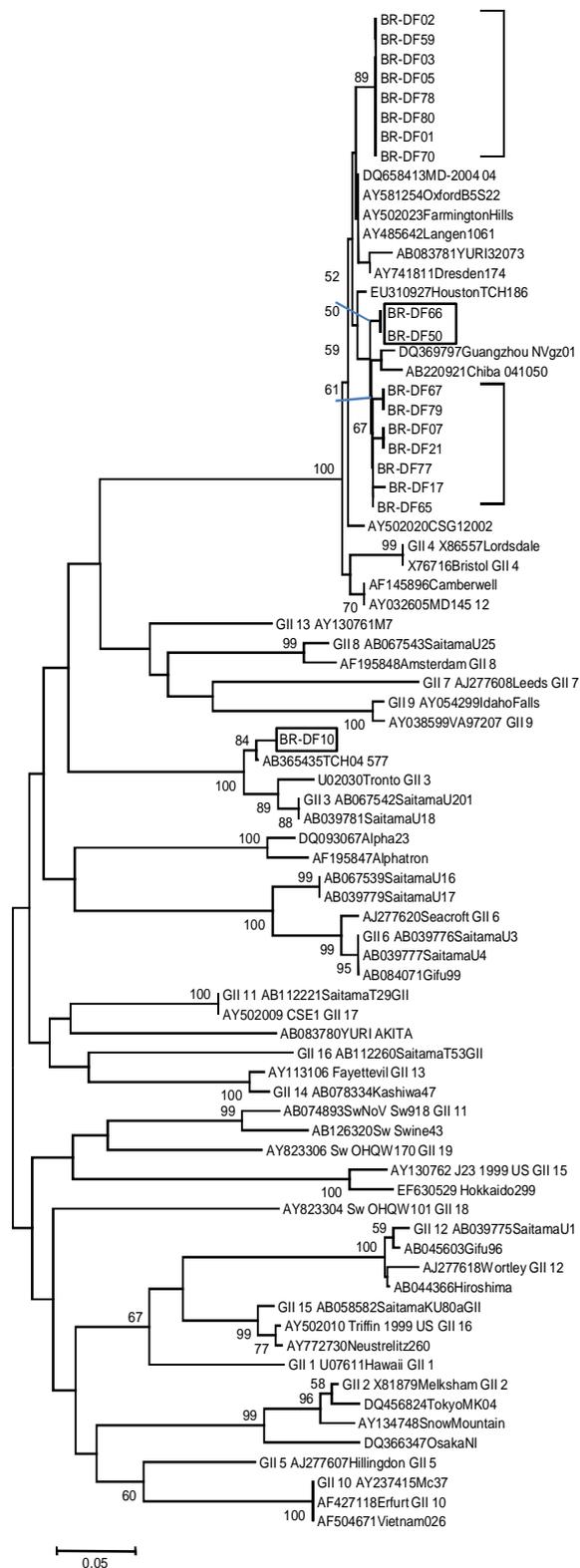
### 4.3 Resultado da árvore filogenética (genotipagem e subgenotipagem)

A partir do sequenciamento da região parcial do gene do capsídeo, verificou-se que todas as amostras isoladas pertencem ao genogrupo II. A análise filogenética destas amostras juntamente com os protótipos de Norovírus disponíveis no *GenBank* identificou apenas uma amostra como pertencente ao genótipo 3 (GII/3) e 16 pertencentes ao genótipo 4 (GII/4), como mostra a figura 7.

A referência BR-DF10 representa a única amostra de norovírus genótipo 3 encontrada no Distrito Federal, durante os anos de 2006 e 2008 pelo presente estudo.

Já as referências dos isolados do Distrito Federal pertencente ao genótipo 4 estão indicadas na árvore filogenética como: BR-DF01, BR-DF02, BR-DF03, BR-DF05, BR-DF07, BR-DF17, BR-DF21, BR-DF50, BR-DF59, BR-DF65, BR-DF66, BR-DF67, BR-DF70, BR-DF77, BR-DF78, BR-DF79 e BR-DF80.

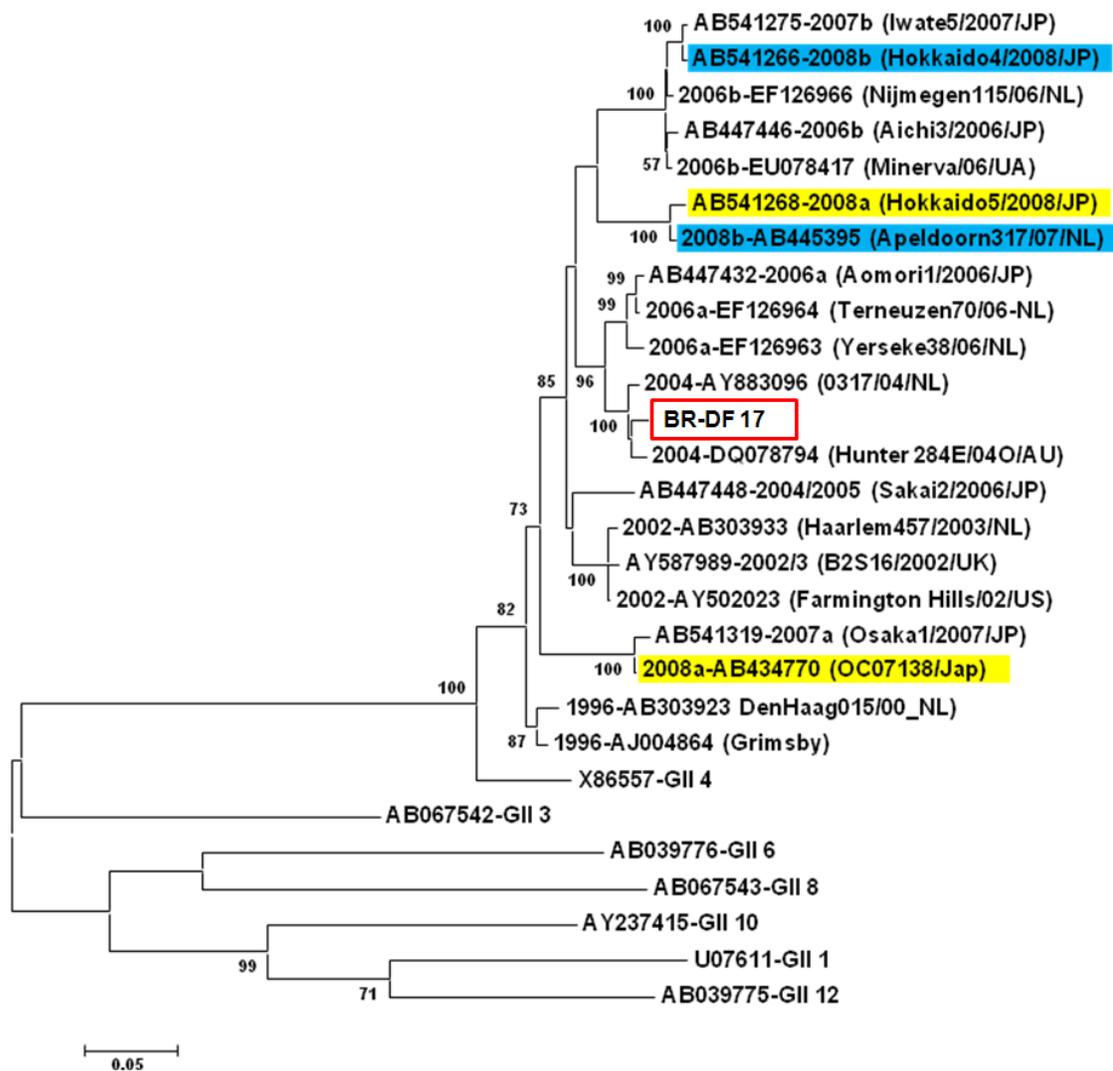
Das amostras supracitadas, seis pertencem a um mesmo surto de gastroenterite ocorrido no Distrito Federal no ano de 2006: BR-DF02, BR-DF03, BR-DF05, BR-DF07, BR-DF17 e BR-DF78. No entanto, de acordo com a figura 7, verifica-se que eles estão agrupados em dois diferentes clusters, o que sugere a presença de diferentes estirpes no local, seja pelo surgimento de novas variantes a partir de mutações, ou seja, pela circulação de diversas estirpes simultaneamente.



**Figura 8** - Análise filogenética das amostras de norovírus baseada na sequência de nucleotídeos da região do capsídeo. Os isolados do Distrito Federal, denominados como BR-DF seguido de numeração, encontram-se indicados por quadro ou agrupamento.

#### 4.4 Árvore filogenética do isolado BR-DF17

A partir do sequenciamento completo da ORF 2, foi feita a análise filogenética do isolado BR-DF17, juntamente com os protótipos de norovírus disponíveis no *GenBank*. Verificou-se que a amostra isolada apresenta maior similaridade com o subgrupo “2004”, conforme figura 8.



**Figura 9** - Análise filogenética para subtipagem da amostra de norovírus GII/4 baseada na sequência de nucleotídeos da ORF 2 (gene do capsídeo). O isolado BR-DF17 está indicado no quadro em vermelho. Referências dos subtipos retiradas do artigo publicado por Motomura et. al (2010) em ordem da referência: nº de acesso e nome do subtipo. Referências dos subtipos retiradas do artigo publicado por Pang et. al (2010) em ordem: nome do subtipo e nº de acesso. As discrepâncias entre os dois artigos encontram-se marcadas nas cores azul e amarelo.

## 5. DISCUSSÃO

Atualmente os norovírus têm sido reconhecidos como os agentes causais mais comuns de surtos de gastroenterites no mundo (PANG *et al.*, 2010). Sabe-se que os genogrupos GI, GII e GIV estão relacionados com infecções em humanos (BULL *et al.*, 2006; LE, *et al.*, 2010) e o genogrupo mais significativo do ponto de vista clínico é o GII, já que apresenta maior prevalência em humanos, além de estar mais frequentemente associado a epidemias, sendo responsável por surtos nos Estados Unidos da América, Europa e Brasil. Dentre os isolados do genogrupo II, o genótipo 4 (GII/4) merece atenção especial, uma vez que é responsável por aproximadamente 62% dos surtos de NoV no mundo, além de ser o causador das cinco maiores pandemias na última década (BULL *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2008, WADL *et al.*, 2010, OZAWA *et al.*, 2007). No Brasil, estudos sobre detecção de NoV GII já foram realizados na Região Centro-Oeste (BORGES, 2006), São Paulo (CASTILHO, 2006), Rio de Janeiro (GALLIMORE, 2004; SOARES, 2007; FERREIRA, 2008), Manaus (MIAGOSTOVICH, 2008), Recife (NAKAGOMI, 2008), Fortaleza (PARKS, 1999), Florianópolis (VICTORIA, 2009), Salvador (CAMPOS, 2008; XAVIER, 2009), entre outros.

A detecção precoce do agente causal em casos de surtos de gastroenterites na comunidade é essencial para evitar a disseminação do vírus, uma vez que permite a tomada de medidas preventivas e tratamento adequado (KHAMRIN *et al.*, 2010). A detecção de norovírus a partir do imunoensaio é uma importante ferramenta em casos de surtos, já que permite um rápido diagnóstico, a partir da execução de protocolo simples, além de não requerer equipamentos sofisticados (THONGPRACHUM *et al.*, 2010). A utilização do kit de imunocromatografia rápida (IP-Noro; Immuno-Probe, Co. Ltd., Saitama, Japan) não detectou nenhum isolado de norovírus em amostras fecais coletadas em 2008 e armazenadas a – 80°C. Em contrapartida, em amostras coletadas nos anos de 2006 e 2007 foram identificados 17 isolados de NoV no Distrito Federal. Para confirmação dos resultados, as amostras foram analisadas por RT-PCR, considerado o método padrão para identificação de norovírus. A partir do resultado do sequenciamento, verificou-se que todas as amostras pertencem ao genogrupo II, confirmando o resultado da

imunocromatografia e corroborando com o resultado de um estudo realizado por Thongprachum e colaboradores (2010) que determinou uma sensibilidade de 74,2%, especificidade de 99,5% e eficácia do imunoensaio de 96,1% quando comparado com RT-PCR. Estudos anteriores realizados para validação do IP-Noro (Immuno-Probe, Co. Ltd., Saitama, Japão) por Khamrin e colaboradores (2008) e Nuyen e colaboradores (2007) apresentaram resultados semelhantes para sensibilidade, especificidade e eficácia: 78,9% e 73,7%; 96,4% e 100% e 92,4% e 95,2%, respectivamente. A partir da análise dos resultados, verifica-se que, apesar do imunoensaio apresentar sensibilidade menor em relação ao RT-PCR, ele pode ser um método alternativo utilizado na triagem de norovírus em amostras fecais, em casos de surtos de gastroenterites.

Dentre as 165 amostras negativas para norovírus GII pelo teste de imunocromatografia rápida, apenas 63 foram submetidas ao Multiplex PCR em outro trabalho. Este método foi capaz de detectar 7 amostras positivas para NoV GII, indicando ser uma ferramenta diagnóstica mais sensível que o imunoensaio (dados não-mostrados).

A análise filogenética das 17 amostras identificadas no Distrito Federal, a partir do sequenciamento da região N-terminal do capsídeo, mostrou que apenas um isolado pertence ao genótipo 3 (GII/3), enquanto o restante pertencente ao genótipo 4 (GII/4), o que confirma sua prevalência mundial. De acordo com Siebenga e colaboradores (2009), desde a última década, os norovírus GII/4 têm sido os principais agentes causais de gastroenterites nos EUA, Europa e Oceania, causando entre 70% a 80% dos surtos, particularmente nos centros de saúde. Durante 5 anos de monitoramento dos surtos de norovírus na Europa (julho de 2001 até junho de 2006), Kroneman e colaboradores (2008) identificaram o genótipo 4 como o principal causador de surtos de gastroenterites em 13 países. Na Itália, por exemplo, um estudo realizado por Ramirez e colaboradores (2009) identificou uma prevalência de 81,4% dos surtos causados por este genótipo.

O surgimento e disseminação de subtipos de GII/4, com múltiplas substituições de aminoácidos na superfície do capsídeo estão frequentemente associadas com grandes magnitudes de epidemias de norovírus, o que torna o genótipo 4 predominante no mundo (SIEBENGA *et al.*, 2007). De acordo com Pang e colaboradores (2010), os subtipos de GII/4 são classificados internacionalmente como novas variantes de GII/4 1996, 2002, 2004, 2006a, 2006b, 2008a e 2008b.

A partir da análise filogenética, utilizando referências das cepas GII/4 dos trabalhos publicados por Motomura e colaboradores (2010) e Pang e colaboradores (2010), observa-se que há uma discrepância entre as subtipagens apresentadas pelos dois trabalhos supracitados (Figura 8). Verifica-se que não há um consenso para nomenclatura dos subtipos do ano de 2008 (2008a e 2008b).

No presente estudo, a estirpe brasileira (BR-DF17) foi caracterizada como pertencente à nova variante “2004”, a partir da análise filogenética representada na figura 8. Esta nova variante foi isolada de uma amostra fecal coletada no ano de 2006, durante um surto de gastroenterite em uma creche no Distrito Federal. No entanto, não é possível afirmar que este isolado representa a população de norovírus do ano de 2006. Outros isolados devem ser classificados a nível de subtipo para que se faça um estudo mais aprofundado sobre a disseminação do vírus no Distrito Federal em relação ao mundo.

## 6. CONCLUSÕES

- O kit de imunocromatografia rápida- IP Noro (Imuno Probe Co. Ltd., Japan) foi capaz de detectar NoVs GII/3 e GII/4 isolados em amostras fecais armazenadas em freezer -80°C. O teste é uma importante ferramenta no combate à disseminação da gastroenterite, especialmente em casos de surtos, uma vez que a detecção precoce do agente causal permite a implantação de medidas preventivas e tratamento apropriado, evitando a disseminação da doença;
- Nos anos de 2006 e 2007, foram encontrados 17 isolados de norovírus genogrupo II (GII) no Distrito Federal. Apenas um isolado pertence ao genótipo 3 (GII/3). O restante pertence ao genótipo 4 (GII/4);
- A amostra BR-DF 17, coletada em 2006, pertence ao subtipo 2004 de GII/4. A partir da caracterização molecular de outros isolados, é possível a realização de um estudo epidemiológico das variantes de norovírus no Distrito Federal.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, D.J., *et al.* Analysis of Amino Acid Variation in the P2 Domain of the GII-4 Norovirus VP1 Protein Reveals Putative Variant-Specific Epitopes. **PloS one**. 2008. Disponível em: < [www.plosone.org](http://www.plosone.org) >. Acesso em: 02.out.2010

ATMAR, R.L. & ESTES, M.K. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14(1), p.15-37, 2001.

BELLIOT, G., *et al.* Norovirus Proteinase-Polymerase and Polymerase Are Both Active Forms of RNA-Dependent RNA Polymerase. **Journal of Virology**, v.79(4), p. 2393–2403, 2005.

BERTOLOTTI-CIARLET, A., *et al.* The 3' End of Norwalk Virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. **Journal of Virology**, v.77(21), p.11603-11615, 2003.

BORGES, A.M.; *et al.* Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.101(7), p.721-724, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7. ed. Caderno 5. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 816 p.

BULL, R. A., *et al.* Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44(2), p.327–333, 2006.

BULL, R.A., *et al.* Rapid Evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. **PLoS Pathogens**, v.6(3), p.1-10, 2010.

CAMPOS, G.S., *et al.* Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. **Archives of Virology**, v.153, p.1125-1129, 2008.

CANNON, J.L., *et al.* Herd Immunity to GII.4 Noroviruses Is Supported by Outbreak Patient Sera. **Journal of Virology**, v.83(11), p.5363–5374, 2009.

CASTILHO, J.G., *et al.* Genetic Diversity of Norovirus among Children with Gastroenteritis in São Paulo State, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44(11), p.3947–3953, 2006.

DONALDSON, E.F., *et al.* Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. **Immunological Reviews**, v.225, p. 190-211, 2008.

FERNÁNDEZ, J.M.R. & GÓMEZ, J.B. Infecciones por norovirus. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v.28(1), p.51-55, 2010.

FERREIRA, M.S.R.; *et al.* Acute Gastroenteritis Cases Associated With Noroviruses Infection in the State of Rio de Janeiro. **Journal of Medical Virology**, v.80, p.338-344, 2008.

GALLIMORE, C. I., *et al.* Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37(3), p.321-326, 2004.

GOMES A.P.R., *et al.* Prevalência de diarreia aguda em menores de cinco anos na cidade do Paranoá, Distrito Federal. **Revista de Saúde do Distrito Federal**, v.16(3/4), p.55-66, 2005.

GREEN, J., *et al.* Capsid Protein Diversity among Norwalk-like Viruses. **Virus Genes**, v.20(3), p:227-236, 2000.

GREEN, K.Y., 2007. Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., **Fields Virology**, 5 ed., Philadelphia:Lippincott Williams and Wilkins,1,949-979.

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

KAGEYAMA, T., *et al.* Coexistence of Multiple Genotypes, Including Newly Identified Genotypes, in Outbreaks of Gastroenteritis Due to *Norovirus* in Japan. **Journal of clinical microbiology**, v.42(7), p.2988–2995, 2004.

KAPIKIAN, A.Z. *et al.* Visualization by immune electron microscopy of 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **Journal of Virology**, v.10, p. 1075-1081, 1972.

KHAMRIN, P., *et al.* Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. **Journal of Virological Methods**, v.147, p.360-363, 2008.

KHAMRIN, P., *et al.* Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. **Journal of Virological Methods**, v.157, p.219-222, 2009.

KHAMRIN, P., *et al.* Heterogeneity of noroviruses and sapoviruses in children admitted to hospital with diarrhea in Thailand. **Journal of Medical Virology**, v.82, p.289–296, 2010.

KITTIGUL, L., *et al.* Norovirus GII-4 2006b variant circulating in patients with acute gastroenteritis in Thailand during a 2006–2007 study. **Journal of Medical Virology**, v.82, p.854–860, 2010.

KIRKING, H. L., *et al.* Likely Transmission of norovirus on an airplane, october 2008. **Clinical Infectious Diseases**, v.50(9), p.1216–1221, 2010.

KOBAYASHI, S., *et al.* Molecular Cloning, Expression, and Antigenicity of Seto Virus Belonging to Genogroup I Norwalk-Like Viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38(9), p.3492–3494, 2000.

KOJIMA, S., *et al.* Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. **Journal of Virological Methods**, v.100, p.107-114, 2002.

KOOPMANS, M., *et al.* Foodborne viruses. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.187-205, 2002.

KRONEMAN, A. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46(9), p.2959-2965, 2008.

LE, V.P., *et al.* Genetic Characterization of Norovirus GII.4 2006b Variants from Jeju Island, South Korea. **Journal of Medical Virology**, v.82, p.1065–1070, 2010.

LINDESMITH, L.C., *et al.* Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. **PLoS Medicine**, v.5(2), p.269-290, 2008.

LOPMAN, B. A., *et al.* Viral Gastroenteritis Outbreaks in Europe, 1995–2000. **Emerging Infectious Diseases**, v.9(1), 2003.

MIAGOSTOVICH, M.P.; *et al.* Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**. v.74(2), p.375–382, 2008.

MORENO-ESPINOSA, S.; FARKAS, T.; JIANG, X. Human Caliciviruses and Pediatric Gastroenteritis. Seminars **Pediatric Infectious Diseases**, v.15, p.237-245, 2004.

MORILLO, S.G., *et al.* Identification and molecular characterization of norovirus in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.619-622, 2008.

MOTOMURA, K., *et al.* Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. **Journal of Virology**, v.84(16), p. 8085–8097, 2010.

NAKAGOMI, T.; *et al.* Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis . **Archives of Virology**, v.153, p.957–960, 2008.

NOEL, J.S., *et al.* Identification of a distinct common strain of “Norwalk-like viruses” having a global distribution. **The Journal of Infectious Diseases**, v.179, p.1334–1344, 1999.

NGUYEN, T.A., *et al.* Immunochromatography tests for detection of rotavirus and norovirus among vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant. **Journal of Tropical Pediatrics**, v.53(4), 2007.

ORLANDI, P.P., *et al.* Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96(5), p.621-625, 2001.

OZAWA, K., *et al.* Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v45(12), p.3996-4005, 2007.

PANG, X.L., *et al.* Influence os novel norovirus GII.4 variants on gastroenteritis outbreaks dynamics in Alberta and the Northern territories, Canada between 2000 and 2008. **Plos one**, v.5(7), p.1-8, 2010.

PARKS, C.G.; *et al.* Genomic diversity of “Norwalk Like Viruses” (NLVs): pediatric infections in a Brazilian shantytown. **Journal of Medical Virology**, v.58, p.426-434, 1999.

PEREIRA H.G., *et al.* Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.78(4), p.483-490, 1983.

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

RAMIREZ, S., *et al.* Emerging GII.4 Norovirus Variants affect children with diarrhea in Palermo, Italy in 2006. **Journal of Medical Virology**, v.81, p.139-145, 2009.

SAMBROOK, K. & RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**. Cold Spring harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Manual de Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas** - MDDA/DDTHA/CVE-SES/SP. 2 ed. São Paulo: SES, 2002. 60p. Disponível em: <[ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/hidrica/manu\\_mdda02.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/manu_mdda02.pdf)>. Acesso em: 02 jan.2011.

SIEBENGA, J. J., *et al.* Epochal Evolution of GGII.4 Norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. **Journal of Virology**, v.81(18), p.9932–9941. 2007a.

SIEBENGA, J. J., *et al.* Gastroenteritis caused by Norovirus GGII.4, the Netherlands, 1994–2005. **Emerging Infectious Diseases**, v.13(1), p.144-146, 2007.

SIEBENGA, J.J., *et al.* Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001–2007. **The Journal of Infectious Diseases**, v.200, p.802-812, 2009.

SOARES, C.C.; *et al.* Detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v.13(8), p.1244-46, 2007.

TATSUMI, M., *et al.* Detection and Differentiation of Norwalk Virus by reverse transcription-polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Medical Virology**, v.68, p.285–290, 2002.

THONGPRACHUM, A., *et al.* Evaluation of an immunochromatography method for rapid detection of noroviruses in clinical specimens in Thailand. **Journal of Medical Virology**, v.82, p.2106–2109, 2010.

TSENG, T. Y. Characteristics of norovirus gastroenteritis outbreaks in a psychiatric centre. **Epidemiology and Infection**, p.1-10, 2010.

VICTORIA, M., *et al.* Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, p.1-8, 2009.

WADL, M.; *et al.* Food-borne norovirus-outbreak at a military base, Germany, 2009. **Infectious Diseases**, v.10(30), p.2-10, 2010.

XAVIER, M.P.T.P., *et al.* Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.42(5), p.438-444, 2009.

XI, J.N.; GRAHAM, D.Y.; WANG, K.N.; ESTES, M.K. Norwalk genome cloning and molecular characterization. **Science**, v.250(4987), p.1580-1583, 1990.

ZHENG, D. P., *et al.* Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology**, v.346, p.312-323, 2006.

ZHENG, D., *et al.* Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48(1), p.168–177, 2010.