

Instituto Oswaldo Cruz
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**PADRONIZAÇÃO DE *PCR* QUANTITATIVO
E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
DE DETECÇÃO DE NOROVÍRUS EM ALIMENTOS**

Tulio Machado Fumian

RIO DE JANEIRO
Junho de 2008

Tese MBCM

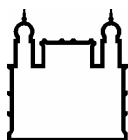
T.M. Fumian

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

TULIO MACHADO FUMIAN

Padronização de *PCR* quantitativo e desenvolvimento de metodologia de detecção de norovírus em alimentos

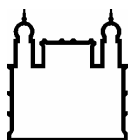
Dissertação apresentada a Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Virologia

Orientadores: Dra. Marize Pereira Miagostovich
Dr. José Paulo Gagliardi Leite

RIO DE JANEIRO

Junho de 2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Tulio Machado Fumian

Padronização de *PCR* quantitativo e desenvolvimento de metodologia de detecção de norovírus em alimentos

ORIENTADORES: Dra. Marize Pereira Miagostovich
Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Examinadores:

Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar – Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz – Presidente

Dra. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza – Biomanguinhos – Fiocruz

Dra. Líliana Spano – Universidade Federal do Espírito Santo

Dra. Caroline Cordeiro Soares – Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Dra. Flávia Barreto dos Santos – Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Rio de Janeiro, 12 de Junho de 2008

"Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais. Teus passos ficaram. Olhes para trás... mas vá em frente, pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te."

Charles Chaplin

Dedico mais esta conquista a **Deus**, aos meus pais, **Deacir** e **Sônia**, e aos meus irmãos, **Hugo**, **Milla** e **Meire**.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a Deus, por que sem ele nada disso seria possível;
- À minha orientadora Dra. Marize Pereira Miagostovich, por todos esses cinco anos e meio de orientação, por sua paciência, conhecimento, dicas, incentivos, confiança, carinho, dedicação e amizade. Um exemplo de pessoa tanto no campo profissional como pessoal. Acolheu-me como uma mãe desde minha primeira iniciação científica no Laboratório de Flavivírus, e a quem eu devo todo meu conhecimento e gosto pela pesquisa científica. Por sempre acreditar em meu trabalho é que estou terminando esta etapa de minha carreira;
- Ao meu orientador Dr. José Paulo Gagliardi Leite, pelo carinho, confiança e incentivo nos meus trabalhos. Exemplo de profissional dedicado, justo e honesto. Tenho o privilégio de tê-lo como chefe e orientador. Hoje em dia, considero Zé Paulo um amigo. Seu profundo conhecimento passado através de seus conselhos, ensinamentos e críticas foram cruciais para o desenvolvimento e finalização desta dissertação;
- À Dra. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza pela excelente revisão e críticas construtivas;
- Às Dras. Ana Maria Coimbra Gaspar, Liliana Spano, Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza, Caroline Cordeiro Soares e Flávia Barreto dos Santos por aceitarem o convite de participar da banca examinadora;
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ;
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro;
- Ao Programa Papes IV, da Vice Presidência de Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Processo nº 400149/2006-0 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento do projeto;
- Às Dras. Ana Carolina de Góes e Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza e à

Eneida Santos de Almeida (Biomanguinhos/ Fiocruz/ RJ) pela orientação e colaboração na etapa de clonagem;

- Ao Dr. Vitor Marin (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ Fiocruz/ RJ) pelo apoio imprescindível e incentivo para o desenvolvimento do estudo com alimentos;

- Aos meus colegas do grupo de pesquisa da Virologia Ambiental. Sem o apoio e amizade de vocês seria muito mais difícil a conclusão deste trabalho. Com certeza sem vocês esta vitória não teria a mesma felicidade. Obrigado pelo companheirismo e pelo espírito de equipe;

- Aos companheiros do Laboratório de Virologia Comparada: Alexandre Fialho, Alexandre Pina, Ana Maria Pinto, Edson Filho, Eduardo Volotão, Flávia Ramos Guimarães, Francisca dos Santos, Gilmar Alcântara, Irene Araújo, Joeler Vargas, Juliana Andrade, Ludmila Rocha, Marco Lessa, Mariela Martinez, Marilda Almeida, Rosane Assis pela ajuda e agradáveis momentos de descontração. Em especial aos uruguaio Matías Victória e Luis Fernando López pela grande amizade desenvolvida e pelos ótimos momentos de diversão, vocês são irmãos; à Marcelle da Silva, Carmen Baur, Juliana Bragazzi e Fabiana Fioretti pela amizade, conselhos e pelos momentos de compreensão, amigas especiais. À Mônica Ferreira e Maria da Penha Xavier pela amizade e pelas várias caronas para Niterói e por estarem sempre dispostas a ajudar em qualquer momento;

- Aos amigos do Laboratório de Flavivírus;

- Aos meus pais, Deacir e Sônia. Agradeço a vocês esta vitória por terem sempre confiado e acreditado em mim, valorizando o estudo como parte essencial para meu crescimento. Grandes incentivadores da minha pesquisa. A alegria e satisfação de vocês me mantém vivo, o amor de vocês me sustenta, e apesar de estar longe sinto esse amor todos os dias e isto me conforta. Obrigado por me sustentarem todos esses anos, e eu sei que vocês sempre deram tudo de si pra eu ficar sempre bem aqui. Vocês são meu orgulho e eu sempre serei grato pelo resto da vida. Agradeço a Deus por tê-los como pais todos os dias;

- Aos meus irmãos Meire, Hugo e Milla pela amizade e companheirismo em todas as horas. Obrigado por poder contar sempre com vocês;
- Aos todos os meus amigos pelas lamentações ouvidas e pelos incentivos;
- Aos meus primos e tios pela presença e preocupação e aos meus avós, que mesmo ausentes, me ajudaram a trilhar este caminho com luz. Obrigada Vó Célia Vô Pimentel e Vô Antônio;

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE QUADROS E TABELA	XV
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 VÍRUS EM ALIMENTOS	18
1.2 GASTROENTERITE	20
1.3 Os NOROVÍRUS	22
1.3.1 <i>Histórico</i>	22
1.3.2 <i>Classificação</i>	23
1.3.3 <i>Morfologia e características biológicas</i>	26
1.3.4 <i>Genoma e proteínas virais</i>	29
1.3.5 <i>Replcação</i>	30
1.4 PATOGÊNESE, PATOLOGIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	31
1.5 EPIDEMIOLOGIA	32
1.6 DIAGNÓSTICO	35
1.6.1 <i>Diagnóstico laboratorial</i>	35
1.7 PREVENÇÃO E CONTROLE	38
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	39
3. OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42

4.1 ESTOQUE DE VÍRUS	42
4.2 ALIMENTOS.....	42
4.3 INICIADORES	42
4.4 AMOSTRAS CLÍNICAS	44
4.5 REAÇÃO QUANTITATIVA EM CADEIA PELA POLIMERASE (qPCR).....	44
4.5.1 Obtenção do “amplicon” para ligação com o vetor de clonagem	44
4.5.2 Ligação do “amplicon” ao vetor de clonagem	46
4.5.3 Transformação bacteriana e purificação do DNA plasmidial contendo o inserto de NV genogrupos I e II	47
4.5.4 Sequenciamento nucleotídico.....	48
4.5.5 Quantificação e obtenção da curva padrão	48
4.5.6 Reação em cadeia pela polimerase qualitativa.....	50
4.6 PADRONIZAÇÃO DE MÉTODO DE RECUPERAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE NOROVÍRUS GENOGRUPO II EM ALIMENTOS.....	51
4.6.1 Queijo tipo “minas”.....	51
4.6.2 Alface	52
5. RESULTADOS.....	54
5.1 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E OBTENÇÃO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES PARA QUANTIFICAÇÃO DE NOROVÍRUS GENOGUPOS I E II.....	54
5.2 PADRONIZAÇÃO DA RT-PCR QUANTITATIVA PARA NOROVÍRUS GI E GII.....	57
5.3 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE RECUPERAÇÃO VIRAL EM AMOSTRAS DE ALIMENTO	59
6. DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÕES	68
8 PERSPECTIVAS.....	69

9 BIBLIOGRAFIA	70
10 ANEXOS	86

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

(-) – polaridade negativa

(+) – polaridade positiva

µL – microlitro

µM – micromolar

A – adenina

A₂₆₀ – absorvância a 260nm

aa – aminoácido

C – citosina

Ca⁺⁺ - íon cálcio

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

CGLAB – Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública

CsCl – cloreto de cézio

DMSO – dimetil-sulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – desoxiribonucleotídeos (dATP, DTTP, dCTP, dGTP)

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

EUA – Estados Unidos da América

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – grama

G – guanina

HAV – vírus da hepatite A

HCl – ácido clorídrico

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

IME – Imuno Microscopia Eletrônica

Kb – kilobase

kDa - kilodalton

LVC – Laboratório de Virologia Comparada

ME – microscopia eletrônica

mg – miligrama

MgCl₂ – cloreto de magnésio

mL – mililitro

mM – milimolar
mm – milímetros
NaOH – hidróxido de sódio
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
ng – nanograma
nm – nanômetro
°C – graus centígrados
P.A. – pró análise
pb – pares de base
PCR – reação em cadeia pela polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
q.s.p. – quantidade suficiente para
RLA – região de leitura aberta
RNA – ácido ribonucléico
RNAm – ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR - reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa
RV – rotavírus
ssRNA - ácido ribonucléico de simples fita
sp – espécie
T – timina
UNT – unidade nefelométrica de turbidez
RNT – região não traduzida
VP – proteína estrutural

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS

- Figura 1.1** Vias de transmissão de 348 surtos de gastroenterite por norovírus, notificados ao *Centers for Disease Control and Prevention*, EUA, no período de janeiro de 1996 a novembro de 2000..... 4
- Figura 1.2** Microscopia eletrônica de agregado de partículas virais pela utilização de anticorpos policlonais..... 6
- Figura 1.3** Análise filogenética da seqüência nucleotídica do gene que codifica para o capsídeo de vírus representantes das famílias *Picornaviridae* e *Caliciviridae*..... 7
- Figura 1.4** Árvore filogenética baseada na seqüência completa de aminoácidos do capsídeo dos norovírus (NV)..... 8
- Figura 1.5** Microscopia eletrônica. (A) Norovírus; (B) *Norovirus like particles* expressas em sistema de baculovírus..... 9
- Figura 1.6** A) Cristalografia de raio-x da estrutura do capsídeo dos *Norovirus Like Particles*; B) Estrutura de uma subunidade da proteína do capsídeo (VP1) mostrada em representação ribossômica. Os domínios protéicos S, P1 e P2, contidos na proteína VP1, estão mostrados em azul, vermelho e amarelo, respectivamente; C) Criomicroscopia eletrônica.....9
- Figura 1.7** Organização genômica dos norovírus... .. 11
- Figura 1.8** Principais vias de transmissão dos norovírus.....14
- Figura 1.9** Representação esquemática do genoma dos norovírus e posições no genoma (A-D) utilizadas para detecção e genotipagem viral..... 18
- Figura 4.1** Fluxograma usado para recuperação e concentração de norovírus em amostras de alimentos..... 33
- Figura 5.1** Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos de PCR correspondente ao fragmento da junção das regiões de leitura aberta 1 e 2 de norovírus GI e GII..... 34
- Figura 5.2** Eletroforese em gel de agarose dos DNAs plasmidiais recombinantes após a purificação utilizando o kit comercial Miniprep®..... 35

Figura 5.3 Eletroforese em gel de agarose de DNAs plasmidiais recombinante, submetidos a digestão com a endonuclease de restrição <i>Eco</i> RI com visualização do inserto clonado.....	36
Figura 5.4 Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão do plasmídio após purificação com o kit Maxiprep.....	37
Figura 5.5 Gráfico ilustrativo da curva padrão utilizada na reação em cadeia pela polimerase quantitativa (<i>qPCR</i>) obtida de diluições seriadas do plasmídio recombinante com o inserto de norovírus.....	38

LISTA DE QUADROS E TABELA

QUADROS

Quadro 4.1 Seqüência e localização no genoma de NV dos iniciadores de cadeia utilizados na <i>PCR</i> qualitativa para norovírus.....	23
Quadro 4.2 Seqüência e localização no genoma dos iniciadores utilizados na <i>qPCR</i> para os genogrupos I e II.....	23
Quadro 4.3 Reagentes utilizados na <i>RT-PCR</i> de norovírus genogrupos I e II.....	25
Quadro 4.4 Reagentes utilizados para a <i>PCR</i> do fragmento da junção das regiões de leitura aberta 1 e 2 (RLA1 e RLA2) dos norovírus genogrupos I e II.....	26
Quadro 4.5 Reagentes utilizados na reação de sequenciamento nucleotídico.....	28
Quadro 4.6 Reagentes utilizados no <i>qPCR</i> para norovírus genogrupo I.....	29
Quadro 4.7 Reagentes utilizados no <i>qPCR</i> para norovírus genogrupo II.....	30
Quadro 4.8 Reagentes utilizados na <i>PCR</i> para amplificação de norovírus GII.....	31

TABELA

Tabela 5.1 Recuperação do genoma de norovírus em amostras de queijo tipo “minas” e alface pela <i>RT-PCR</i> e <i>qRT-PCR</i>	40
--	-----------

RESUMO

A gastroenterite de origem alimentar é um problema de saúde pública em todo o mundo. Neste âmbito, a investigação da presença de vírus em alimentos se torna uma exigência, principalmente devido ao crescente número de surtos de gastroenterite relacionados ao consumo de alimentos e em particular, frutas, hortaliças, leite, ostras e água contaminados. Atualmente, os norovírus (NV) são reconhecidos como importantes agentes etiológicos de surtos de gastroenterite de origem alimentar em países desenvolvidos, embora pouco se saiba sobre o papel destes vírus nos países em desenvolvimento. O presente estudo teve como objetivo estabelecer método de amplificação para detecção quantitativa utilizando a técnica de reação em cadeia pela polimerase quantitativa (*qPCR*) para NV genogrupos (G) I e II e desenvolver metodologia de recuperação e detecção de NV GII em amostras de alimentos (queijo tipo “Minas” e alface). O *qPCR* padronizado que tem como alvo de amplificação a junção da região de leitura aberta 1 e 2 dos NV GI e GII, apresentou limite de detecção de 5 cópias de genoma viral por reação para ambos os testes. A metodologia de recuperação e detecção baseou-se na eluição dos vírus, seguida de clarificação e concentração utilizando membrana negativamente carregada e eluição em solventes inorgânicos. Na superfície de ambas as amostras de alimento foram semeadas 50µL de suspensão fecal contendo aproximadamente 10⁶/µL partículas de NV GII ou diluições seriadas na base 10 desta suspensão. A eficiência de recuperação de NV variou de 5,2 a 72,3% para as amostras de alface e de 6,0 a 56,3% para as amostras de queijo tipo “minas” nas diferentes diluições utilizadas. Os resultados observados mostraram que o método desenvolvido foi eficiente para a recuperação e detecção de NV, podendo ser aplicado para pesquisa viral direta nas matrizes de alimentos testados. A padronização de métodos moleculares para a detecção de NV em alimentos tem sido recomendada como base laboratorial para a vigilância epidemiológica destas infecções, representando um avanço no entendimento da via das infecções gastroentéricas por NV e para possíveis intervenções, com objetivo de diminuir ou eliminar riscos à saúde.

ABSTRACT

Food-borne gastroenteritis is an important problem of public health worldwide. The investigation for virus presence in food becomes a requirement, mainly due to the increasing emergence of outbreaks of gastroenteritis related to the consumption of different foods, in particular fruits, vegetables, milk, oysters and contaminated water. Currently, the Noroviruses (NV) are recognized as the most important etiological agent of outbreaks of food-borne gastroenteritis in developed countries, although little is known about the role of these viruses in developing countries. This study aimed to establish a quantitative amplification method (*qPCR*) to detect NV genogroups (G) I and II, and to develop a methodology to recover and detect virus in food samples such as cheese “minas” type and lettuce. The *qPCR* standardized that target the junction of the open reading framing (ORF) -1 and 2 of NV GI and GII, presented a limit of detection of five viral genome copies by reaction to both tests. The method of recovery and detection was based on the viral elution followed by clarification and a concentration step by using negatively charged membrane with elution in inorganic solvents. On the surface of both samples of food were seeded 50 μ L of fecal suspension containing approximately 10⁶/ μ L particles of NV GII or serial dilutions in the base 10 of this suspension. The NV recovery efficiency ranged from 5.2 to 72.3% for lettuce samples and 6.0 to 56.3% for the cheese “minas” type sample in the different dilutions. The results showed that the method developed was efficient for recovery and detection of NV, and may be applied to viral research direct on food matrices. The standardization of molecular methods for detecting NV in food has been recommended as laboratory basis for epidemiological surveillance of these infections, representing a breakthrough in understanding the route of gastroenteritis infection by NV and for possible interventions in order to reduce or eliminate the health risks.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus em alimentos

A transmissão de vírus veiculada por alimentos foi evidenciada no início do século passado, quando surtos de poliomelite foram associados ao consumo de leite. Na década de 1950, foi relatada a primeira transmissão de vírus da hepatite A (HAV) por moluscos bivalves na Suécia e posteriormente, nos Estados Unidos da América (EUA). Nos anos seguintes, surtos de origem alimentar foram notificados, contudo nenhum vírus pôde ser isolado *in vitro*. Durante muitos anos, os estudos de transmissão viral por alimentos restringiram-se à detecção de vírus em moluscos bivalves e ao risco potencial de contaminação pelo uso de águas residuais não tratadas para irrigação de plantações (Gerba, 2006).

Com o desenvolvimento e aplicação de ferramentas moleculares de detecção mais sensíveis, os vírus foram implicados como os principais agentes etiológicos de doenças associadas a alimentos contaminados nos países desenvolvidos (Bresse et al, 2002; Koopmans e Duizer, 2004).

O número de surtos documentados associados ao consumo de alimentos contaminados no mundo está em crescimento (Koopmans et al, 2002). Esta tendência deverá continuar principalmente pelo aumento do consumo de alimentos crus e pelo comércio internacional globalizado. A maioria dos produtos consumidos nos países industrializados são importados de países onde as condições sanitárias e higiene no cultivo, colheita, manuseio e transporte dos alimentos são por vezes inadequadas, aumentando o risco de contaminação viral. Recentes surtos de hepatite e gastroenterite causados, respectivamente, pelos HAV e pelos norovírus (NV), descritos na Europa e EUA foram transmitidos por alimentos contaminados importados, demonstrando a importância do comércio internacional no aumento da transmissão das doenças de etiologia viral (Dentinger et al, 2001).

Exceto em moluscos bivalves, a contaminação dos alimentos em geral ocorre na superfície e tem como principais causas a irrigação dos mesmos com água contaminada, manipulação imprópria e contaminação cruzada. A captação de vírus humanos nas raízes e no interior dos produtos parece ser um evento

improvável, contudo já foi demonstrado em estudos anteriores (Chancellor et al, 2006; Butot et al, 2007). No caso de moluscos bivalves, as estruturas internas são contaminadas dificultando a recuperação dos vírus (Boxman et al, 2006; Gerba, 2006; Roda et al, 2007).

A contaminação dos alimentos por manipuladores é de difícil controle, principalmente pela existência de um número considerável de infecções assintomáticas (Parashar et al, 1998; Anderson et al, 2001). Koopmans e Duizer (2004) demonstraram que apesar de manipuladores contaminados estarem implicados na maioria dos surtos, a contaminação pode ocorrer em qualquer etapa do processo produtivo (Daniels et al, 2000).

Até recentemente acreditava-se que a contaminação de vírus entéricos nos alimentos poderia apenas ter origem humana, estando limitada à manipulação imprópria, à contaminação cruzada entre os alimentos e contaminação destes por água contaminada. Contudo, surtos causados pelo vírus da hepatite E (HEV), tem demonstrado o potencial zoonótico destes vírus e sua transmissão pelo consumo de carne crua ou pouco cozida (Mishiro et al, 2004; Tei et al, 2004). A relação próxima entre os NV humanos e alguns calicivírus animais (bovinos e suínos), sugere a possibilidade da ocorrência de transmissão inter-espécies (Koopmans et al, 2002).

O problema fundamental quanto à detecção de vírus em alimentos é a baixa concentração de partículas virais presentes nas amostras, o que requer grandes volumes de alimentos para avaliar o risco da infecção. A presença de um pequeno número de partículas virais infecciosas tem uma significativa probabilidade de causar infecção (Guévremont et al, 2006). Em contraste, para ocorrer uma infecção bacteriana é necessário a ingestão de milhares de células para se ter a mesma probabilidade de infecção. Contudo, os vírus tem que ser extraídos ou removidos da matriz alimentar antes de serem isolados em cultivo celular ou detectados por métodos moleculares. Sendo assim, é necessário a redução do volume do ensaio e a remoção de substâncias tóxicas e/ou inibidoras. Esta etapa limita a sensibilidade dos ensaios para detecção viral em alimentos

tornando o processo mais difícil e oneroso quando comparado com métodos de detecção de bactérias.

O crescente número de surtos de gastroenterites de etiologia viral relacionadas com a ingestão de alimentos, associado ao desenvolvimento de métodos mais sensíveis de detecção viral direta nestas matrizes e a crescente exigência de controles microbiológicos, torna este tipo de investigação um campo extremamente promissor. Nesse contexto, o desenvolvimento de metodologias de recuperação e detecção de NV é relevante, uma vez que sendo vírus de transmissão fecal-oral, os NV são os maiores responsáveis por surtos de gastroenterite aguda veiculados por alimentos.

1.2 Gastroenterite

O termo gastroenterite inclui uma variedade de estados patológicos do trato gastrointestinal, cuja principal manifestação é a diarreia, que pode vir acompanhada por náusea, vômitos e dor abdominal. Calcula-se que, anualmente, ocorram mais de 700 milhões de casos de gastroenterite aguda somente em crianças menores de cinco anos no mundo. A mortalidade é estimada em 1,8 milhão de casos (WHR, 2005), sendo o impacto destas infecções mais dramático nos países em desenvolvimento (Glass et al, 2005).

A gastroenterite de origem alimentar é um problema de saúde pública em todo mundo e os vírus destacam-se como os agentes infecciosos responsáveis por grande parte destes surtos (Parashar et al, 2003).

Nos EUA, apesar da mortalidade associada à infecção entérica ser baixa, a gastroenterite associada ao consumo de alimentos contaminados contabiliza 76 milhões de casos, 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes anuais (Mead et al, 1999). Neste país, os vírus foram responsáveis por 67% dos surtos de gastroenterites, comparado com 14,2% e 9,7% por *Campylobacter spp* e *Salmonella spp*, respectivamente. Somente os NV foram responsáveis por mais de 96% de surtos não bacterianos de gastroenterite em adultos (Mead et al,

1999), sendo a grande maioria de origem alimentar. Segundo Fankhauser e colaboradores (2002), durante o período de janeiro de 1996 a novembro de 2000, os alimentos foram implicados em 39% dos surtos de gastroenterite por NV ocorridos naquele país (Figura 1.1). Atualmente, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) fornece guias e manuais de recomendação para investigação de surtos de NV, incluindo procedimentos para obtenção de amostras, prevenção e controle da doença, além de manter permanentemente informativos atualizados sobre a ocorrência de surtos (CDC, 2005).

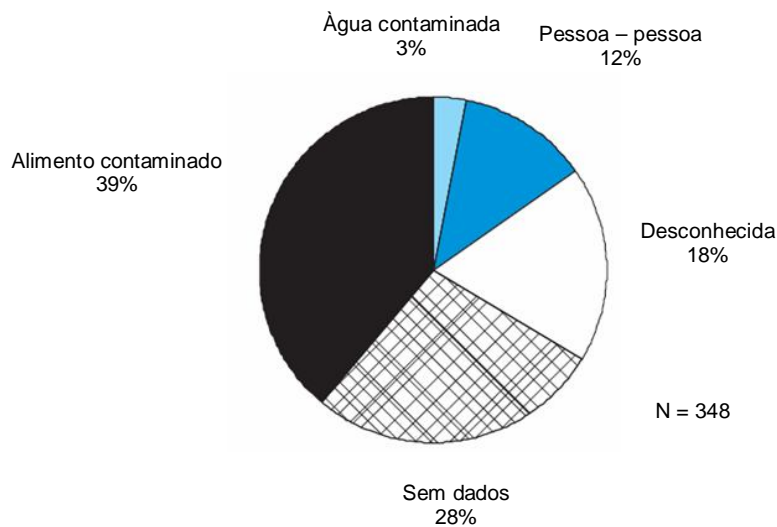


Figura 1.1 Vias de transmissão de 348 surtos de gastroenterite por norovírus, notificados ao *Centers for Disease Control and Prevention*, EUA, no período de janeiro de 1996 a novembro de 2000. (Adaptado de Fankhauser et al, 2002).

No Reino Unido, somente em 1995, foram estimados 2,37 milhões de casos de gastroenterite, sendo que uma grande proporção destes foi associada à ingestão de alimentos contaminados (Lopman et al, 2003). Na Europa, um projeto combinado de pesquisa e vigilância de vírus tem como objetivo mapear as vias de transmissão para se estimar a proporção de casos de origem alimentar. O Consórcio europeu de vírus transmitidos por alimentos (FBVE) é constituído

atualmente por 12 laboratórios em nove países. Cada país mantém pelo menos um laboratório apto a detectar NV por um método molecular e quase todos realizam protocolos de detecção a partir de amostras alimentares. Esses países mantêm um banco de dados nacional de surtos e casos de gastroenterite por NV (Lopman et al, 2002; Koopmans et al, 2003).

1.3 Os Norovírus

1.3.1 Histórico

Os primeiros estudos para descoberta e elucidação de novos agentes etiológicos responsáveis por surtos de gastroenterite aguda foram baseados na indução da doença em voluntários utilizando filtrados de lavados fecais denominados “lavados fecais livre de bactérias” (Green, 2001).

A doença diarréica aguda induzida após administração oral de *pool* de suspensão fecal livre de bactérias de pacientes de um surto de gastroenterite de um hospital em Nova York (EUA), evidenciou a etiologia viral desta infecção. Em estudos posteriores, passagens seriadas destes filtrados em voluntários permitiram a observação de imunidade curta (algumas semanas) e longa (9 – 15 meses) para esse agente. Entretanto, todas as tentativas de identificação do agente etiológico foram sem sucesso (Green, 2001).

Em 1970, uma segunda geração de estudos com voluntários foi iniciada nos EUA e Reino Unido, com o objetivo de identificar o agente etiológico nestas suspensões fecais. Filtrados fecais de quatro surtos de gastroenterite foram estudados em voluntários. Um desses surtos aconteceu em uma escola secundária em Norwalk, Ohio, em outubro de 1968 quando em um período de dois dias, 50% (116/232) dos estudantes e professores desenvolveram doença gastrointestinal. O período médio de incubação e duração da doença foi de 48 e 24 horas, respectivamente. A doença foi descrita como *Winter Vomiting Disease* devido a semelhança com a síndrome descrita por Zahorsky (1929). As principais manifestações clínicas neste surto foram vômito e náusea, contudo alguns

pacientes desenvolveram diarreia. Estudos laboratoriais não permitiram identificar o agente etiológico (Kapikian, 2000).

Filtrados de suspensões fecais livres de bactéria de casos secundários do surto de Norwalk, induziram doença similar em voluntários humanos. Estudos sugeriram que o agente causador da doença era um vírus pequeno (< 36 nm), resistente ao éter e estável a temperaturas elevadas. Entretanto, não foi possível a propagação deste agente em cultivo celular ou a reprodução da doença em um modelo animal. Posteriormente, Kapikian e colaboradores no ano de 1972 utilizando imuno microscopia eletrônica (IME) identificaram Norwalk vírus (NV), como o agente etiológico deste surto (Kapikian, 2000) (Figura 1.2).

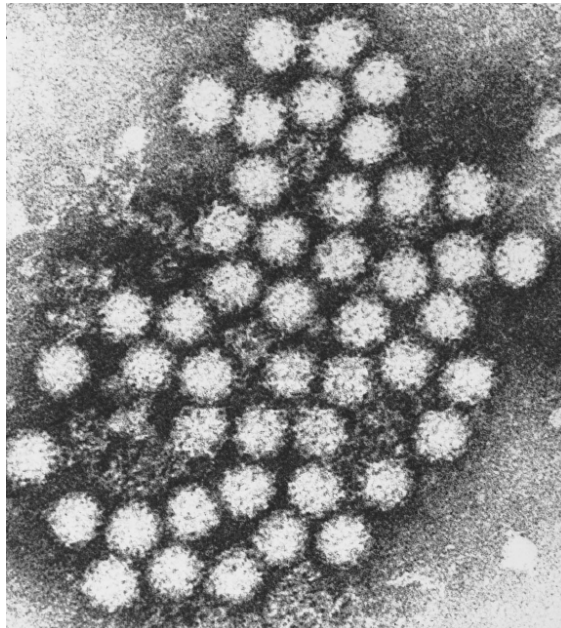


Figura 1.2 Microscopia eletrônica de agregado de partículas virais pela utilização de anticorpos policlonais. Kapikian (2000).

1.3.2 Classificação

Os *Norwalk viruses* foram inicialmente descritos como pertencente as famílias *Picornaviridae* ou *Parvoviridae*, baseado na aparência do vírion pela microscopia eletrônica (ME). Entretanto, a detecção de uma proteína estrutural

principal em partículas virais purificadas de fezes humanas foi descrita como uma característica da família *Caliciviridae* (Terceiro Encontro do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus [ICTV], 1979). Em 1990, a clonagem do genoma do “Norwalk vírus” confirmou a classificação destes como membro desta família. O nome *Caliciviridae* deriva da palavra latina “calix”, que significa cálice. No entanto, geralmente estes vírus não apresentam sua morfologia típica quando observados pela ME (Green et al, 2000; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/ICD-1011.htm> em 10 de janeiro de 2006).

Atualmente, a família *Caliciviridae* é constituída por quatro gêneros: *Norovirus* (NV), representado pelo “Norwalk virus”; *Vesivirus*; *Lagovirus*; e *Sapovirus* (Figura 1.3) (Mayo, 2002). Os gêneros *Norovirus* e *Sapovirus* formam o grupo dos calicivírus humano (HuCV).

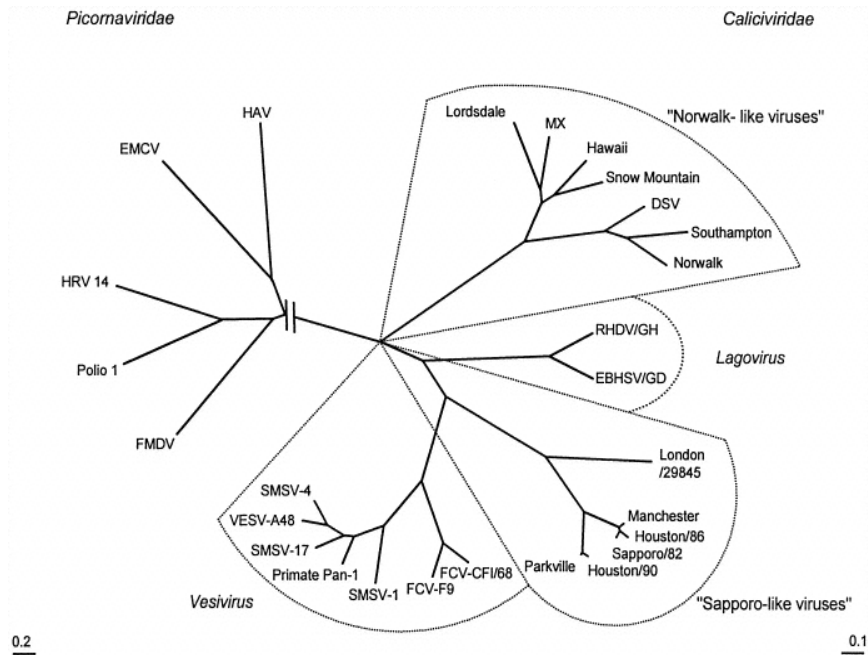


Figura 1.3 Análise filogenética da seqüência nucleotídica do gene que codifica para o capsídeo de vírus representantes das famílias *Picornaviridae* e *Caliciviridae*. (Green et al, 2000).

Inicialmente a classificação dos NV baseou-se na reação antígeno-anticorpo utilizando soros de voluntários (Green et al, 2001). Entretanto a reatividade cruzada entre as amostras demonstrou grande diversidade antigênica destes vírus. A sorotipagem direta por neutralização não é possível devido à inexistência de um sistema de isolamento viral em cultivo celular. Desta forma, a caracterização por métodos moleculares, entre os quais a transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (*RT-PCR*) e principalmente o sequenciamento nucleotídico, foram estabelecidos como as ferramentas mais apropriadas para caracterização destes vírus (Ando et al, 2000; Katayama et al, 2002; Zheng et al, 2006). Com base na seqüência completa de aminoácidos (aa) do gene que codifica para a proteína do capsídeo, Zheng e colaboradores (2006) estabeleceram a classificação do gênero *Norovirus* em três níveis de acordo com percentual de identidade dos aa: Cepa (0 – 14,1%), Genotipo (14,3 – 43,8%) e Genogrupo (44,9 – 61,4%) e definiram cinco genogrupos (GI, GII, GIII, GIV e GV) e vinte e nove genotipos (8 em GI, 17 em GII, 2 em GIII e 1 em GIV e GV). Os genogrupos GI, GII e GIV representam os NV humanos, exceto GII/11 e GIII e GV, incluem amostras de bovinos e murinos, respectivamente (Figura 1.4).

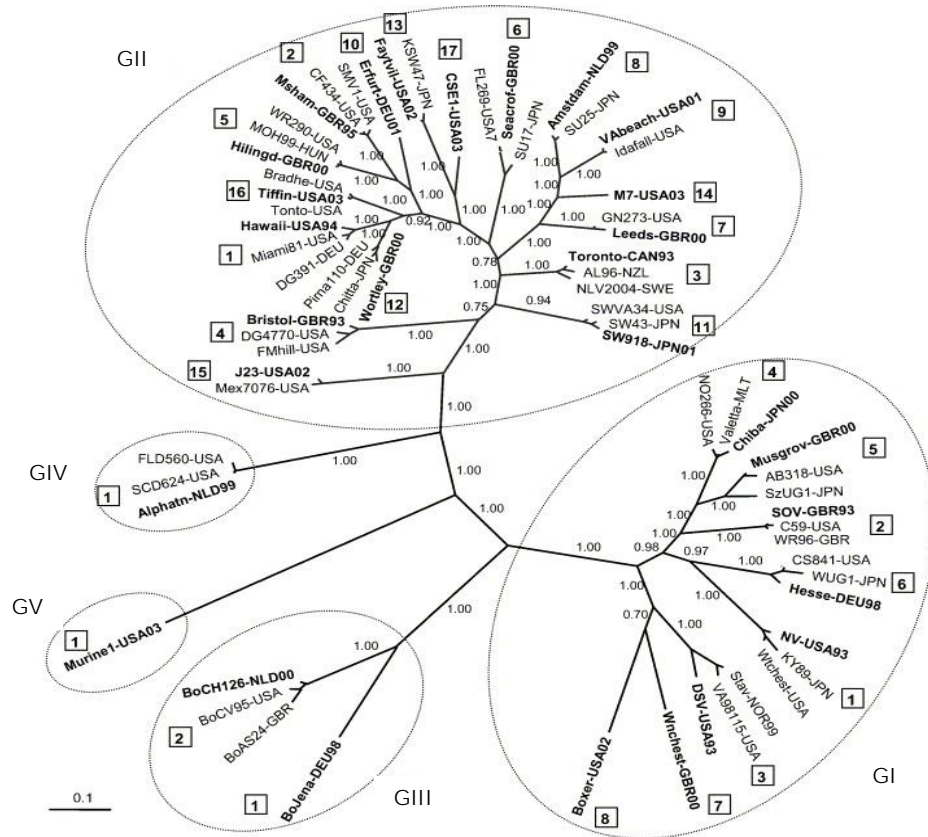


Figura 1.4 Árvore filogenética baseada na seqüência completa de aminoácidos do capsídeo dos norovírus. Os números nas caixas indicam o Genotipo. G: Genogrupo. (Zheng et al, 2006).

1.3.3 Morfologia e características biológicas

A análise morfológica dos NV em fezes é limitada pelo baixo número de partículas presentes nas amostras. Pela ME com contraste negativo as partículas virais exibem uma borda externa não-característica, diferenciando os NV dos outros calicivírus (Atmar e Estes, 2001).

A expressão da proteína do capsídeo de NV, em sistema de baculovírus, resultou na produção de *virus like particles (VLPs)*, que tem sido utilizadas para estudos morfológicos e bioquímicos (Richards et al, 2003) (Figura 1.5).

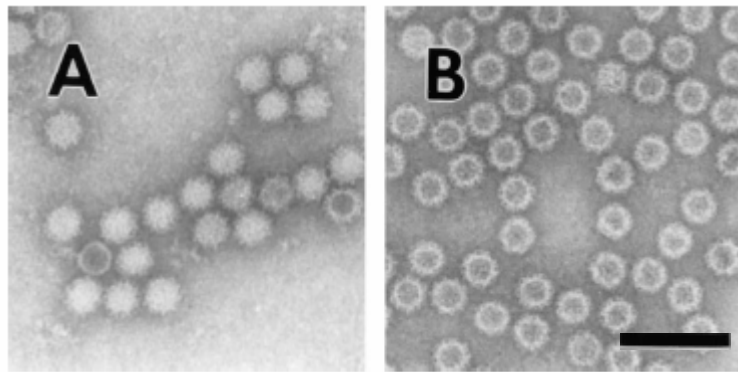


Figura 1.5 Microscopia eletrônica. **(A)** Norovírus; **(B)** *Norovírus like particles* expressas em sistema de baculovírus. Barra 100nm. (Atmar e Estes, 2001).

Estudos por cristalografia de raio-x demonstraram a localização precisa da seqüência primária de aminoácidos da proteína do capsídeo destes vírus (Figura 1.6 A e B). A criomicroscopia eletrônica (CME), juntamente com a técnica de processamento de imagem computacional, utilizada para o estudo tri-dimensional da estrutura das *VLPs*, demonstrou que os NV exibem uma simetria icosaédrica com 180 moléculas de proteína do capsídeo organizada em 90 dímeros (figura 1.6 C) (Prasad et al, 1999; Estes et al, 2006).

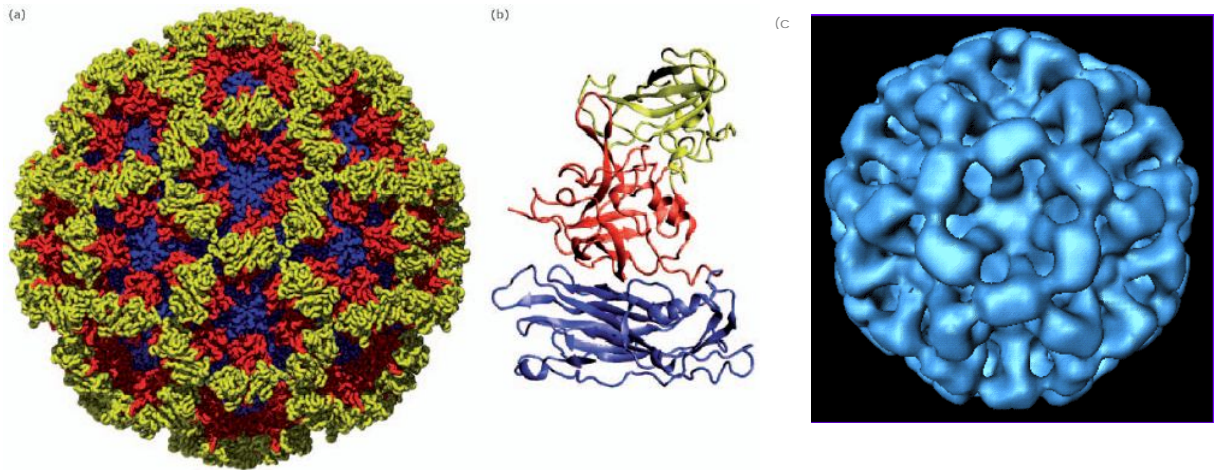


Figura 1.6 A) Cristalografia de raio-x da estrutura do capsídeo dos “Norovirus Like Particles”; B) Estrutura de uma subunidade da proteína do capsídeo (VP1) mostrada em representação ribossômica. Os domínios protéicos S, P1 e P2, contidos na proteína VP1, estão mostrados em azul, vermelho e amarelo, respectivamente; C) Criomicroscopia eletrônica. (Prasad et al, 1999; Estes et al, 2006).

Os NV humanos possuem densidade de 1,33 a 1,41g/cm³ em cloreto de cézio (CsCl) e se distinguem morfológicamente dos outros calicivirus, quando observados pela ME (Green, 2001). Os NV mantêm infecciosidade em voluntários após: a) exposição do filtrado fecal a pH 2,7 por 3 horas à temperatura ambiente; b) tratamento com éter a 20%, a 4^oC por 18 horas e c) incubação a 60^oC por 30 minutos.

Os NV são resistentes à inativação pelo tratamento com cloro na concentração de 3,75 a 6,25mg/L (cloro residual livre de 0,5 a 1,0mg/L) , usualmente encontrada na água distribuída pelo sistema de abastecimento. Os NV são inativados após tratamento com cloro a 10mg/L, sendo mais resistentes que os poliovírus tipo 1, rotavírus humano (RV) e ao bacteriófago f2 (Keswick et al, 1985; Green, 2001).

1.3.4 Genoma e proteínas virais

O genoma dos NV consiste de um RNA de fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 7,7 Kb. É organizado em uma região não traduzida (RNT) localizada na extremidade 5', seguida por três Regiões de Leitura Aberta (RLA), uma RNT e uma cauda poli(A) localizada na extremidade 3'. O vírion ainda apresenta um RNA subgenômico, que contém RLA-2 e 3 e uma RNT na extremidade 3' (Bertolotti-Ciarlet et al, 2003). A RLA-1 codifica uma poliproteína de aproximadamente 200kDa de massa, que é processada pela protease viral, 3C-like protease (3CL^{pro}), dando origem às proteínas não estruturais: p48, NTPase, p22, VPg, 3CL^{pro} e RdRp (Figura 1.7) (Belliot et al, 2005). A RLA-2 codifica a maior proteína estrutural do capsídeo (VP1) e a RLA-3 a menor (VP2) (Belliot et al, 2003; Gutierrez-Escolano et al, 2003) (Figura 1.7). O vírion é composto de 90 dímeros de VP1 e uma ou duas cópias de VP2. Juntamente com a VP1, a VP2 é sintetizada tanto pelo genoma viral, quanto pelo RNA subgenômico (Hardy, 2005).

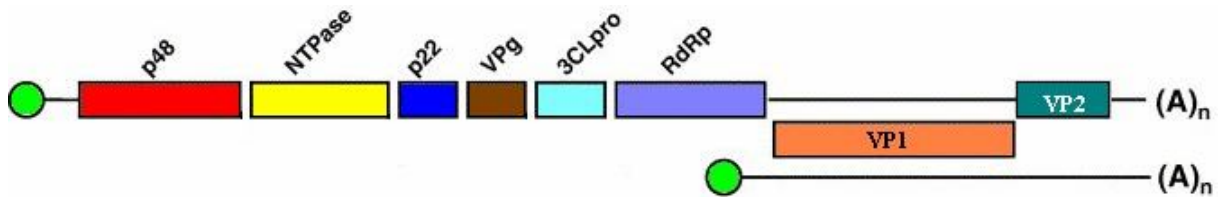


Figura 1.7 Organização genômica dos norovírus. p48: Proteína p48; NTPase: Proteína Nucleosídeo Trifosfatase; p22: Proteína p22; VPg: Proteína de União ao Genoma; 3CLpro: Protease; RdRp: Polimerase; VP1: Proteína Principal do Capsídeo; VP2: Proteína Menor do Capsídeo. Círculo Verde: VPg; (A)_n: Cauda Poli(A). (Hardy, 2005).

A constituição da VP1 varia entre 530 a 555 aa, com massa molecular de 58 a 60kDa. Dois domínios conservados envolvem uma região central variável, que parece conter determinantes antigênicos que definem a especificidade do genótipo (Hardy, 2005). Cento e oitenta cópias da proteína principal VP1 estão organizadas para formação do capsídeo viral icosaédrico. VP1 se desdobra em

dois maiores domínios designados *S* e *P*. O domínio *P* interage em contatos diméricos aumentando a estabilidade do capsídeo e forma as projeções na superfície do vírion observados pela ME (Hardy, 2005). O nível de expressão da proteína VP1 é regulado positivamente pela presença da VP2 e da RNT na extremidade 3' (Bertolotti-Ciarlet et al, 2003).

A VP2 varia de 208 a 268 aa, com massa molecular entre 22 a 29kDa, exibindo grande variabilidade entre os genótipos. É uma proteína rica em aa básicos com ponto isoelétrico maior que 10. Esta composição sugere que tal proteína se liga a RNA auxiliando no processo de encapsidação do RNA genômico (Hardy, 2005).

A proteína não estrutural p48, localizada na extremidade N-terminal da RLA-1, está implicada no processo de replicação viral. A proteína VPg, de massa molecular de 15kDa, liga-se covalentemente ao RNA genômico e subgenômico, atuando em funções variadas nos ciclos de replicação. O papel desta proteína na síntese de moléculas de RNA viral, foi proposto devido a sua participação no processo de recrutamento de ribossomos.

Estudos enzimáticos com proteínas recombinantes, confirmaram que o precursor da proteína 3CL^{pro} – RdRp é uma proteína bifuncional com atividade de protease e polimerase (Hardy, 2005).

A polimerase viral, que se estende do aa 1281 até a extremidade C-terminal da RLA-1, apresenta elementos catalíticos e estruturais característicos de polimerase de outros vírus RNA com polaridade positiva (Hardy, 2005).

1.3.5 Replicação

A estratégia de replicação dos NV, elucidada até o momento, segue a estratégia de replicação de outros vírus com genoma de RNA de polaridade positiva. Após a interação da partícula viral com a célula do hospedeiro pelo receptor viral específico, o carboidrato presente na superfície celular, ocorre a entrada do vírus na célula e, subsequente liberação do RNA viral no citoplasma

celular. O início da tradução da fita positiva do genoma é mediado por interações da proteína *VPg*, ligada ao *RNA* genômico, com mecanismos de tradução celular. A *RLA-1* é inicialmente traduzida para produção de uma poliproteína não estrutural que, em seguida, é processada pela proteinase viral, originando proteínas não estruturais, entre as quais, a *RNA* polimerase viral. A síntese da fita negativa de *RNA*, a partir do molde do *RNA* genômico positivo, se inicia na extremidade 3' da fita molde positiva e envolve interações com proteínas virais. A fita negativa serve como molde tanto para a transcrição do *RNA* genômico como subgenômico. A grande quantidade de *RNA* subgenômico positivo viral, serve como molde para a tradução das proteínas estruturais *VP1* e *VP2*. A replicação do *RNA* viral está associada com membranas celulares do hospedeiro. Os mecanismos de empacotamento do *RNA*, a maturação e a liberação da partícula viral ainda não estão totalmente esclarecidos (Green, 2007).

1.4 Patogênese, patologia e manifestações clínicas

O período de incubação dos NV varia de 10 a 51 horas, com média de 24 horas e os sintomas clínicos, geralmente tem duração de 1 a 2 dias. Durante infecção experimental em voluntários, a excreção de partículas virais detectadas pela IEM, coincidiu com o pico da doença e não excedeu mais do que 72 horas após os primeiros sintomas. Contudo, a excreção viral tem sido detectada por mais de sete dias após o início dos sintomas quando analisadas pela *RT-PCR* (Green, 2007).

Um estudo realizado com voluntários adultos submetidos à administração de filtrado fecal positivo para NV demonstrou a excreção de partículas virais por mais de duas semanas após a fase sintomática. Alguns voluntários apresentaram infecção assintomática com excreção viral (Graham et al, 1994; Okhuysen et al, 1995). Estudo recente em uma clínica pediátrica demonstrou que o tempo médio da excreção viral em crianças menores de três anos foi de 16 dias, variando de 5 a 47 dias (Murata et al, 2007).

O sítio de replicação primária dos NV não está bem estabelecido, embora tenha sido evidenciada a replicação destes vírus na parte superior do trato intestinal. Biopsias do jejuno exibindo lesões histopatológicas, com encurtamento dos vilos intestinais e mucosa intacta foram observadas em voluntários que desenvolveram doença gastroentérica, após administração de amostras de NV (Green, 2001).

Um atraso no esvaziamento gástrico foi observado em indivíduos infectados em um estudo com voluntários doentes que desenvolveram lesão jejunal típica. Tem sido proposto que a função motora gástrica anormal é responsável pela náusea e vômito associados a esses agentes virais (Green, 2001).

Clinicamente, a doença se manifesta por dores abdominais com ou sem náuseas, vômito e/ou diarreia caracterizada por fezes aquosas e sem muco. O desenvolvimento dos sintomas pode ser de forma gradual ou abrupta e, em geral, adultos apresentam diarreia como sintoma predominante da doença, enquanto náusea e vômito são mais freqüentes em crianças. Outras manifestações clínicas comumente observadas são dores de cabeça, febre baixa, calafrios e mialgias, ocorrendo em 25 a 50% das pessoas infectadas (Thornton et al, 2004).

1.5 Epidemiologia

O modo de transmissão dos NV é predominantemente por via fecal-oral, pela ingestão de água e alimentos contaminados, pelo contato pessoa a pessoa, ou mesmo por aerossóis produzidos durante o vômito (Figura 1.8) (Marks et al, 2000; Pang et al, 2000; Moreno-Espinosa et al, 2004).

A contaminação de alimentos e água utilizados para consumo ou para atividades recreacionais pode servir como fonte primária de surtos, uma vez que os NV são bastante estáveis e resistentes ao tratamento da água com cloro, podendo permanecer infecciosos por prolongados períodos nestes ambientes (Parashar & Monroe, 2001).

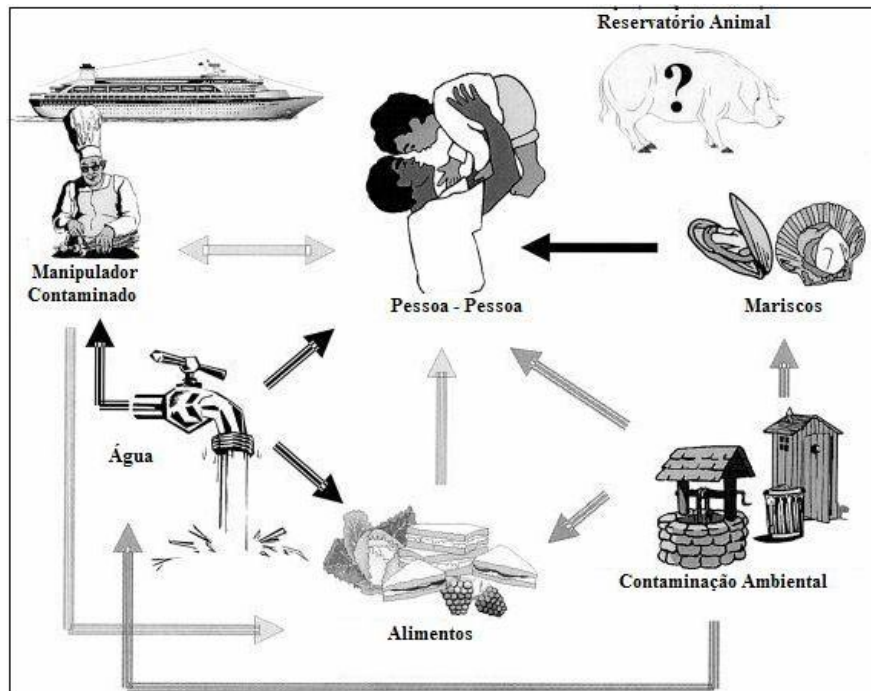


Figura 1.8 Principais vias de transmissão dos norovírus. (Adaptado de Moreno-Espinosa et al, 2004).

Atualmente, os NV são considerados os mais importantes agentes etiológicos causadores de surtos de gastroenterite não bacteriana, principalmente em ambientes fechados (Greenberg et al, 1979; Vinje et al, 1996; Dedman et al, 1998; Inouye et al, 2000). Os surtos epidêmicos em geral ocorrem em hospitais, acampamentos, áreas recreacionais, escolas, creches, asilos, cruzeiros marítimos, enfermarias, restaurantes, eventos sociais, famílias, áreas militares e em comunidades. Podem variar em quantidade de pessoas envolvidas, desde pequenos grupos familiares até milhares de indivíduos, como por exemplo, em um surto escolar descrito no Japão que envolveu 5 mil crianças (Matsuno et al, 1997; Green, 2007). Nos EUA e na Europa, 93% (217/233) e 85% (3157/3714) dos surtos de gastroenterite não bacteriano foram associados aos NV, respectivamente (Fankhauser et al, 2002; Lopman et al, 2003).

Os NV infectam indivíduos de todas as idades, o que raramente ocorre com os outros vírus que causam gastroenterite (Glass et al, 2000).

A maioria dos indivíduos nos países desenvolvidos e em desenvolvimento apresenta evidência de infecção por NV antes da idade adulta, refletindo a distribuição global e a natureza endêmica desses vírus. Estudos com ensaios imunoenzimáticos utilizando NV *VLPs* para detecção de anticorpos contra NV GI e GII demonstraram que a prevalência de anticorpos para cada genogrupo aumenta gradualmente por idade principalmente nos países desenvolvidos. A prevalência de anticorpos contra GII é maior que o GI na maioria dos estudos, refletindo a predominância da circulação de cepas do genogrupo II (Noel et al, 1997; Green, 2007). GII/4 tem sido o genotipo mais frequentemente detectado nos surtos de diarreia aguda por NV no mundo, mostrando sua predominância e distribuição global (Fankhauser et al, 1998; Hale et al, 2000; Koopmans et al, 2001; Lopman et al, 2002).

O papel dos alimentos na epidemiologia das infecções por NV, tem sido demonstrado pelo aumento de surtos relacionados ao consumo de alimentos contaminados. Os NV são extremamente infecciosos, com dose infectante de menos de 10 partículas virais. A alta taxa de ataque (50-70%), o elevado número de portadores assintomáticos, o prolongado período de excreção viral (acima de duas semanas após o término dos sintomas) e a resistência elevada dos vírus fora do hospedeiro contribuem para o caráter explosivo dos surtos de NV de origem alimentar (Caul & Appleton, 1982; Green et al, 2001).

Somente nos EUA, estima-se que 40% dos 23 milhões de casos de gastroenterites por NV estejam relacionados à ingestão de alimentos contaminados. Vários tipos de alimentos têm sido apontados como veículo de transmissão viral, como, produtos de padaria, saladas, alimentos frios, gelo, água e frutos do mar (Parashar et al, 1998; Daniels et al, 2000; Anderson et al, 2001; Le Guyader et al, 2004; Green, 2007).

O papel dos NV na etiologia das gastroenterites vem sendo confirmado pelo relato de surtos em diferentes países, tais como Estados Unidos (Fankhauser et al, 2002), Peru (Parashar et al, 2004), Austrália (Wright et al, 1998), Chile (O’Ryan et al, 2000), países da Europa e Canadá (Ponka et al, 1999; Rockx et al, 2002) e em países do continente Asiático (Okitsu-Negishi et al, 2004).

No Brasil diversos estudos têm demonstrado a importância dos NV como agente etiológico causador da gastroenterite aguda (Parks et al, 1999; Borges et al, 2006; Castilho et al, 2006; Soares et al, 2007; Victória et al, 2007; Ribeiro et al, 2008).

1.6 Diagnóstico

Em estudo onde foram analisados 38 surtos de NV, dados indicaram que um diagnóstico inicial da doença, pode ser efetuado durante um surto se os seguintes critérios forem observados: a) exclusão de patógenos bacterianos e parasitários; b) ocorrência de vômito em mais de 50% dos casos; c) média de duração da doença entre 12 a 60 horas e d) período de incubação for entre 24 e 48 horas (Kaplan et al, 1982). Posteriormente, Hedberg e Osterholm (1993) demonstraram que o período de incubação e o percentual de pacientes com vômito e febre são determinantes. Assim, o critério “b” do modelo de Kaplan foi substituído por um novo critério: percentual de pacientes com vômito maior que percentual de pacientes com febre. Como o vômito é um sintoma menos freqüente em surtos envolvendo adultos, a inclusão do percentual de pacientes com vômito e febre aumenta a sensibilidade do critério.

Esses critérios ainda permanecem válidos, obtendo sensibilidade de 68% e especificidade de 99%, quando são comparados com métodos de diagnóstico laboratoriais mais sensíveis (Estes et al, 2006).

1.6.1 Diagnóstico laboratorial

Os NV não são propagados em cultivos celulares convencionais. Estudos utilizando a técnica de microcarreadores foram conduzidos demonstrando a infecção e a replicação do *RNA* viral dos NV em células epiteliais de intestino humano em 3D (Straub et al, 2007). Até o momento não existe modelo animal que possa reproduzir a doença (Glass et al, 2000; Green et al, 2007).

As partículas de NV podem ser observadas nas fezes pela ME a partir dos primeiros sintomas da infecção (Kapikian, 1994). A ME detecta aproximadamente 10^6 partículas por mg de fezes, sendo esta a taxa de excreção destes vírus em pessoas infectadas. A ausência de partículas com a característica peculiar dos HuCV (forma de cálice) pode dificultar sua identificação por este método (Caul & Appelenton, 1982; Doane et al, 1994; Glass et al, 2000)

Os ensaios imunoenzimáticos (EIE) para detecção de NV tornaram-se possíveis quando Jiang e colaboradores (1992) estabeleceram um sistema para expressão de proteínas do capsídeo do NV em baculovírus, permitindo tanto a obtenção de antígeno viral, como a produção de soro hiperimune em animais (Jiang et al, 1992; Lopman et al, 2002). Antígenos recombinantes foram desenvolvidos para detecção de diferentes vírus do gênero *Norovirus*, tais como: México, Snow Mountain e Hawaii (Noel et al, 1997; Atmar & Estes, 2001; Lopman et al, 2002). Embora os EIEs apresentem baixa especificidade devida à grande diversidade genética desses vírus é uma metodologia aplicável em surtos como teste de triagem. Um teste mais sensível e específico, como a *RT-PCR* deve ser aplicado nas amostras que apresentarem resultado negativo por EIE (Jiang et al, 2000; Richards et al, 2003; Cardoso & Borges, 2005).

A clonagem e o sequenciamento dos vírus Norwalk (Jiang et al, 1990) e Southampton (Lambden et al, 1993) permitiram grandes avanços nos estudos e na determinação da importância epidemiológica dos NV como agente etiológico causador de diarreia aguda. Após o sequenciamento completo do genoma dos HuCV (Jiang et al, 1993; Lambden et al, 1993; Dingle et al, 1995; Lopman et al, 2002) diversos iniciadores foram desenhados visando a amplificação de diferentes regiões alvo do genoma para serem utilizados no diagnóstico pela técnica de *RT-PCR* (Figura 1.9). Esta técnica apresenta sensibilidade de aproximadamente 10^2 a 10^3 partículas virais, sendo capaz de detectar o vírus até duas semanas após a infecção (Yamazaki et al, 1996; Parashar et al, 1998; Atmar e Estes, 2001; Lopman et al, 2002).

Devido a grande diversidade genética dos NV, não existem iniciadores capazes de amplificar todos os genotipos dos NV humanos. Frequentemente é

necessário a utilização de uma mistura de iniciadores específicos para a detecção dos diferentes genogrupos (GI, GII, GIV) mesmo quando se utiliza iniciadores que amplifiquem regiões conservadas do genoma, como a RLA1 (*RpRd*). Para a caracterização genética dos NV é necessário a realização do sequenciamento parcial do gene que codifica a proteína do capsídeo viral *VP1*, considerado uma região de grande variabilidade genética (De Leon et al, 1992; Ando et al, 1995; Green et al, 1995, 2000; Lopman et al, 2002; Vinjé et al, 2004; Zheng et al, 2006).

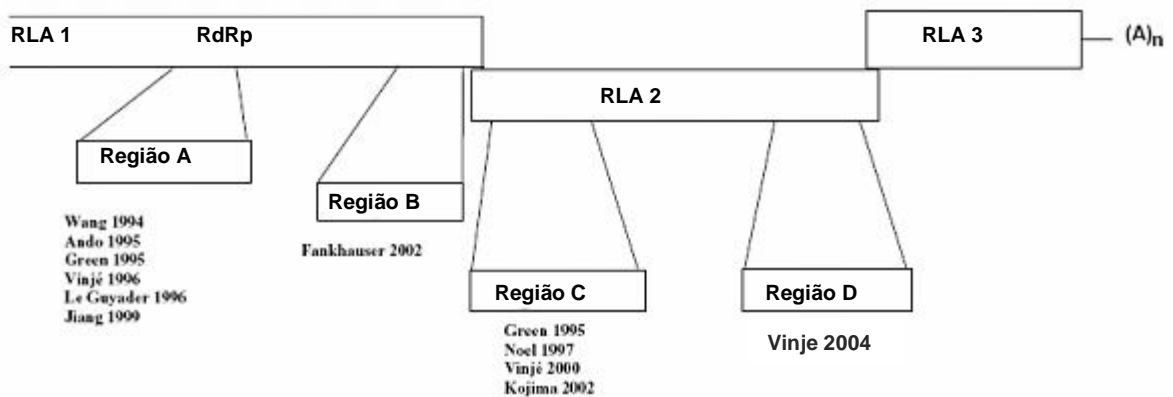


Figura 1.9 Representação esquemática do genoma dos norovírus e posições no genoma (A-D) utilizadas para detecção e genotipagem viral. (Adaptado de Vinjé et al, 2004).

Ensaio de amplificação quantitativa, mais especificamente o método de TaqMan[®], apresentam menor risco de contaminação em relação ao *PCR* convencional, sendo capazes de estimar o número de cópias iniciais na amostra. São metodologias rápidas, e na maioria das vezes mais sensíveis e específicos que o *PCR* qualitativo. Protocolos de amplificação genômica quantitativo para detecção direta de NV GI e GII em espécimes clínicos têm permitido a detecção de NV em amostras consideradas negativas pela ME, EIE e mesmo pela *RT-PCR* qualitativa (Kageyama et al, 2003; Trujillo et al, 2006; Vainio et al, 2006).

1.7 Prevenção e controle

Nos surtos de gastroenterite aguda a interrupção da transmissão, determinada pela identificação e eliminação da fonte de infecção, é a principal estratégia para o controle, especialmente em ambientes fechados onde acontece a maioria dos surtos atribuídos aos NV. É fundamental a atenção na higiene das mãos após o contato com o paciente ou com objetos que podem estar contaminados (Wilhelmi et al, 2003). Os NV podem ser transferidos de indivíduos com mãos contaminadas para até sete superfícies limpas diferentes, com implicação direta na origem de surtos e dispersão da infecção. O uso de detergentes é pouco efetivo na eliminação da contaminação destes vírus, sendo necessária a utilização de uma solução de hipoclorito/detergente para a descontaminação de superfícies (Barker et al, 2004).

A vacina é um instrumento de prevenção que poderia ser utilizada para redução da morbidade, uma vez que as medidas de saneamento não são suficientes para evitar a ocorrência de gastroenterite aguda por NV. *VLPs* foram utilizadas para a imunização de camundongos e voluntários e a imunogenicidade foi avaliada pela presença de anticorpos no soro e nas fezes. As formulações orais de *VLPs* expressas em baculovírus e em plantas transgênicas utilizadas nestes estudos produziram resposta humoral de mucosa nos camundongos desafiados. Estes resultados representam os primeiros avanços para a obtenção de uma futura vacina anti-NV (Estes et al, 2000; Nicolier-Jamot et al, 2004; Tacket, 2005).

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Em todo o mundo, investigações epidemiológicas de surtos de gastroenterite aguda associados à infecção por NV foram dificultadas pela ausência de metodologias apropriadas para a detecção viral. Somente a partir da década de 1990, com a disponibilidade de metodologias moleculares de diagnóstico, os NV passaram a ser reconhecidos como importantes agentes etiológicos desta infecção. É notável o papel predominante dos NV em surtos de gastroenterite relacionados ao consumo de alimentos. A importância epidemiológica dos NV nos surtos de origem alimentar tem sido demonstrada pelo estabelecimento de redes laboratoriais de vigilância nos países industrializados, embora pouco se saiba sobre o papel destes vírus nos países em desenvolvimento (Lund & Lindqvist, 2004, Vidal et al, 2005).

A grande maioria dos países, principalmente da América Latina, não possui um sistema de vigilância para infecções virais transmitidas por alimentos, principalmente devido à indisponibilidade de métodos de recuperação e detecção direta a partir da matriz alimentar. Nestes países, a definição do agente etiológico de surtos de gastroenterite de origem alimentar tem sido realizada por investigações epidemiológicas que associam a detecção do vírus nas fezes de pessoas que adoeceram ao consumo de determinados alimentos (Vidal et al, 2005).

A investigação de vírus em alimentos se torna, a cada dia, uma exigência no âmbito da Saúde Pública, embora não exista inspeção sistemática ou mesmo legislação que estabeleça critérios para segurança alimentar no que diz respeito a presença de vírus nos alimentos. Recentemente, a otimização e padronização de métodos para detecção de NV em alimentos tem sido recomendada como base laboratorial para a vigilância epidemiológica destas infecções. A identificação direta dos NV em alimentos envolvidos em surtos é obtida raramente, principalmente devido a complexidade da matriz alimentar, dos baixos níveis de contaminação e da diversidade genética.

As metodologias de detecção quantitativa e de recuperação de NV desenvolvidas neste estudo serão de grande utilidade para a investigação de surtos de gastroenterite de origem alimentar, pela detecção direta de vírus em alimentos, o que permitirá a determinação de fontes e vias de contaminação. Em adição, estas metodologias poderão ser utilizadas para avaliação da eficiência de processos de tratamento dos alimentos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer metodologias de eluição/concentração e de detecção quantitativa para recuperação de NV em alimentos.

3.2 Objetivos Específicos

- Amplificar e clonar e seqüenciar fragmentos específicos de NV GI e GII em plasmídios, para estes serem utilizados no estabelecimento de um método quantitativo de amplificação em tempo real para ambos os genogrupos.

- Padronizar método de recuperação e concentração de NV genogrupo II a partir de amostras de queijo branco tipo “Minas” .

- Padronizar método de recuperação e concentração de NV genogrupo II a partir de amostras de alface.

- Avaliar a especificidade do *qPCR* frente as amostras clínicas do LVC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estoque de vírus

NV padrão GI e GII, foram utilizadas para o estabelecimento de metodologias de *RT-PCR* quantitativo. Estes vírus foram gentilmente cedidos pelo Dr. Christopher Gallimore (*Enteric Virus Unit, Virus Reference Department, Centre for Infections, Health Protection Agency, Colindale, London, United Kingdom*).

Para a padronização da metodologia de detecção viral em alimentos uma suspensão fecal de NV GII, genótipo 4 (DQ997040), do Laboratório de Virologia Comparada (LVC) do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ foi utilizada como inóculo nas amostras de queijo tipo “minas” e alface.

4.2 Alimentos

As amostras de queijo tipo “minas” e de alface, utilizadas no processo de padronização do método de eluição/concentração de NV foram obtidas do comércio local.

4.3 Iniciadores

Para as metodologias de *RT-PCR* qualitativa e quantitativa foi utilizado iniciador randômico hexâmero pd(N)₆[®] (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) para síntese de *cDNA* e iniciadores específicos previamente descritos (Beuret et al, 2002; Kageyama et al, 2003) (Quadros 4.1 e 4.2).

Quadro 4.1 Seqüência e localização no genoma de NV dos iniciadores de cadeia utilizados na PCR qualitativa para norovírus.

Iniciadores (polaridade)	Seqüência 5' – 3'	Posição do genoma (nt)
Mon 432 ⁺ (+) ¹	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	5093-5114
Mon 434 ⁻ (-) ¹	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	5285-5305
Mon 431 ^{**} (+) ¹	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	5093-5114
Mon 433 ^{**} (-) ¹	GGA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	5285-5305

¹ Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA.

*Genogrupo I, **Genogrupo II

I: inosina, R: purina (A/G), Y: pirimidina (C/T), S: forte (C/G), W= (A/T).

A Posição dos iniciadores é baseada no NV (M87661) para GI e GII Lordslade (X86557).

Quadro 4.2 Seqüência e localização no genoma dos iniciadores utilizados na qPCR para os genogrupos I e II.

Iniciadores (polaridade)	Seqüência 5' – 3'	Região do genoma
Genogrupo I		
COG 1F (+) ¹	CGY TGG ATG CGI TTY CAT GA	RLA-1
COG 1R(-) ¹	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C	RLA-2
Ring 1a (sonda) ¹	^{Fam-} AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA ^{-Tamra}	RLA-1
Ring 1b (sonda) ¹	^{Fam-} AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA ^{-Tamra}	RLA-1
Genogrupo II		
COG 2F (+) ¹	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	RLA-1
COG 2R (-) ¹	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	RLA-2
Ring 2 (sonda) ¹	^{Fam-} TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT ^{-Tamra}	RLA-1

¹ Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA.

R: purina (A/G); Y: pirimidina (C/T); B: não A; R: A ou G; N= A/C/T/G.

4.4 Amostras clínicas

Foram selecionadas cinco amostras positivas para RV, cinco para astrovírus (AstV), cinco para adenovírus (AdV), cinco para NV GII e uma amostra para NV GI de suspensões fecais provenientes de casos de gastroenterite aguda armazenadas no LVC. Cinquenta amostras provenientes de um surto de NV ocorrido no interior do estado do Rio de Janeiro, (33 amostras positivas e 17 negativas) foram testadas pelo qPCR para avaliação dos resultados em relação ao RT-PCR qualitativo (Ferreira et al, 2008).

4.5 Reação quantitativa em cadeia pela polimerase (qPCR)

Foram estabelecidas as técnicas de *RT-PCR* para detecção e quantificação de NV genótipos I e II, previamente descritas (Kageyama et al, 2003).

Inicialmente, foram realizadas etapas de amplificação e clonagem de um fragmento de genoma viral para obtenção de plasmídios recombinantes e posterior estabelecimento da curva padrão para quantificação viral.

Todas as etapas dos procedimentos de clonagem foram realizadas no Laboratório de Tecnologias Recombinantemente do Instituto de Tecnologias em Imunobiológicos – FIOCRUZ, adequado para este tipo de procedimento.

4.5.1 Obtenção do “amplicon” para ligação com o vetor de clonagem

Moléculas molde de *RNA* de NV GI e GII extraídas a partir de suspensões fecais, com o kit QIAamp Viral *RNA* Mini Kit® (Qiagen, Inc., Valencia, Califórnia, EUA) foram utilizadas para a síntese do *cDNA* com a utilização de um iniciador randômico. Após desnaturação (97°C por 7 minutos, 4°C por 2 minutos) de 10µL de *RNA* e 2µL de dimetil sulfoxido (DMSO – Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) os reagentes foram adicionados ao *RNA* e a mistura foi incubada a 42°C por 1 hora, seguido de incubação de 7 minutos a 95°C. No quadro 4.3 estão descritos os reagentes que foram utilizados para a reação de síntese do *cDNA*.

Quadro 4.3 Reagentes utilizados na *RT-PCR* de norovírus genogrupos I e II

Reagentes	Volume (μL)
ssRNA	10
DMSO	2,0
H ₂ O DNase/RNase livre ¹	23,5
Tampão 10X ²	5,0
dNTP (dCTP/dTTP/dATP/dGTP(10 μM) ¹	4,0
MgCl ₂ (50 mM) ²	2,5
Iniciador randômico pd(N) ₆ [®]	2,0
RT Superscript II (200U/ μL) ²	1,0
Total	50

¹ Gibco[®], Califórnia, EUA

² Invitrogen[™], Califórnia, EUA

Em seguida, 10 μL do cDNA foram submetidos a uma reação em cadeia pela polimerase (*PCR*) com a utilização dos iniciadores específicos para cada genogrupo (GI: COG1F e 1R; GII: COG2F e 2R) (Kageyama et al, 2003).

Os reagentes utilizados na *PCR* estão descritos no Quadro 4.4. A amplificação genômica foi realizada em Termociclador (Peltier Thermal Cycler PTC 200[®], MJ Research, Massachusetts, EUA) consistindo de um ciclo de desnaturação a 94°C por 3 minutos, 40 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 90 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Foi realizado um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Quadro 4.4 Reagentes utilizados para a PCR do fragmento da junção das regiões de leitura aberta 1 e 2 (RLA1 e RLA2) dos norovírus genogrupos I e II.

Reagentes	Volume (µL)
H ₂ O <i>DNase/RNase</i> livre ¹	9,0
dNTP (10 µM) ¹	2,0
Tampão 10 X ¹	2,5
MgCl ₂ (50 mM) ²	1,0
Pool de Iniciadores COG1R e 1F ou COG2R e 2F (100µM) ³	0,2
Taq Platinum Polimerase (5U/µL) ²	0,3
<i>cDNA</i>	10,0
Total	25,0

¹ Gibco®, Califórnia, EUA

² Invitrogen™, Califórnia, EUA

³ Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA

Para análise dos “amplicons” foi realizada eletroforese a 100V por 40 minutos onde 10µL do produto amplificado acrescido com 1µL de azul de bromofenol (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) foram aplicados em gel de agarose (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) a 1,5% em Tris-Ácido Bórico-EDTA 1X (100 mM Tris, 90 mM Ácido bórico, 100mM EDTA, pH 8,3) impregnado com 3µL de brometo de etídio 10mg/mL (Gibco®, Califórnia, EUA). Os amplicons foram visualizados com o auxílio de um transluminador (Labnet, Edison, NJ, EUA) e registrados por um sistema de captura e fotodocumentação (UVP, Mitsubishi, Japão).

4.5.2 Ligação do “amplicon” ao vetor de clonagem

A ligação dos “amplicons” foi realizada utilizando o *kit* TOPO TA Cloning® (Invitrogen™, Califórnia, EUA) segundo as recomendações do fabricante.

Brevemente, 5µL do “amplicon” obtido, 1µL do vetor de clonagem (Topo TA Cloning® 2.1, Invitrogen™, Califórnia, EUA) e 1µL de *Salt solution* foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente.

4.5.3 Transformação bacteriana e purificação do DNA plasmidial contendo o inserto de NV genogrupos I e II

Células bacterianas competentes (*E. coli* cepa TOP10F), previamente preparadas pelo método de cloreto de cálcio (CaCl₂) (Sambrook et al, 2001), foram descongeladas em banho de gelo. A estas células, foram acrescentados 3µL do produto da ligação e em seguida incubadas durante 30 minutos em banho de gelo. Essa reação foi submetida a um choque térmico por 90 segundos a 42°C e uma nova incubação de banho de gelo foi realizada por um período de 10 minutos.

A recuperação das células bacterianas, após choque térmico, foi realizada pela adição de 300µL de meio Luria Bertani líquido (LB: 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,0) sem antibióticos, e incubação a 37°C sob forte agitação (250rpm) por 1 hora (Gyrotech Water Bath Shaker Modelo G75, New Brunswick, Scientific Edison, New Jersey, EUA) (Sambrook et al, 2001).

Após esta etapa, foi realizado o plaqueamento em uma única placa contendo meio LB sólido (LB líquido contendo 1,5% (p/v) de ágar suplementado contendo 100µg/mL de ampicilina, 0,1mM de IPTG e 40µg/mL de X-Gal). Após incubação a 37°C por 16 horas, 10 colônias bacterianas correspondentes a 10 clones plasmidiais foram transferidos para tubos contendo 5mL de meio LB líquido suplementado com ampicilina 50µg/mL. Os tubos foram incubados por 16 horas sob agitação constante de 150rpm a 37°C (Gyrotech Water Bath Shaker Modelo G75, New Brunswick, Scientific Edison, New Jersey, EUA).

Para a seleção dos clones bacterianos contendo o plasmídeo com o inserto, foi realizada a extração do DNA plasmidial a partir das culturas dos clones utilizando-se o Kit *Miniprep DNA Purification System*® (Promega Corporation, Madison, Winsconsin, EUA) de acordo com o protocolo descrito pelo do fabricante.

4.5.4 Sequenciamento nucleotídico

Após a extração, o *DNA* plasmidial foi submetido a uma reação de *PCR* com os respectivos iniciadores como previamente descrito no item 4.5.1, para a caracterização do inserto por sequenciamento de nucleotídeos. Os “amplicons” obtidos pela *PCR* foram purificados utilizando o kit comercial *QIAquick® PCR Purification kit* (QIAGEN™, Valencia, CA, EUA) e quantificados em gel de agarose a 1,5% utilizando o marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen™, Califórnia, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Para o sequenciamento direto dos “amplicons” foi utilizado o kit comercial *Big Dye Terminator® v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, CA, EUA) e iniciadores utilizados na *PCR* (Quadro 4.2). Foram utilizadas colunas *CENTRI-SEP®* (Princeton Separations, CA, EUA) para purificação da reação. O seqüenciador automático modelo *ABI 3100* (Applied Biosystems) foi utilizado para obtenção dos eletroferogramas.

Quadro 4.5: Reagentes utilizados na reação de sequenciamento nucleotídico

Reagentes	Volume (µL)
<i>DNA</i> (25ng)	2,0 - 10,0
Tampão de seqüenciamento (5X)*	2,0
Big Dye*	2,0
Iniciadores de cadeia COG1R e 1F ou COG2R e 2F (0,4µM)	2,0
H ₂ O <i>DNase/RNase</i> livre q.s.p. * ¹	10,0 - 20,0

* Invitrogen™, Califórnia, EUA; *¹ Gibco®, Califórnia, EUA

4.5.5 Quantificação e obtenção da curva padrão

A concentração dos plasmídios recombinantes contendo os insertos de NV GI e GII foi determinada pela leitura de 50µL do produto em espectrofotômetro com comprimento de onda de 260nm de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). A quantificação

medida é fornecida em ng/μL, sendo transformada em número de cópias/μL (nº cópias/μL) de acordo com a fórmula:

	Concentração (g/μL)		
Número de cópias/μL=	(Número de pares de base do plasmídio recombinante) x 660	X	6,022 x 10 ²³

Após determinação do número de cópias do genoma viral, realizou-se diluições seriadas na base 10 dos plasmídios com concentrações variando de 5 x 10⁶ até 5 X 10⁰ cópias para obtenção da curva padrão. Estas diluições foram alíquotadas e armazenadas a -70°C para posterior utilização.

Em uma microplaca óptica de 96 cavidades (MicroAmp[®], Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) foram adicionados 5μL de cada diluição, em duplicata, e 20μL da mistura de reagentes. A reação do qPCR foi realizada em plataforma ABI 7500 (Applied Biosystem, Califórnia, EUA) com um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos seguido de 45 ciclos de 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos e 56°C por 1 minuto (Quadros 4.6 e 4.7).

Quadro 4.6 Reagentes utilizados no qPCR para norovírus genogrupo I.

Reagentes	Volume (μL)
H ₂ O DNase/RNase livre ¹	3,250
Taq Man [®] Universal PCR Master MIX ²	12,5
Iniciador COG 1F (10μM) ³	1,5
Iniciador COG 1R (10μM) ³	1,5
Sonda Ring 1a (10μM) ³	0,625
Sonda Ring 1b (10μM) ³	0,625
cDNA	5,0
Total	25,0

¹ Gibco[®], Califórnia, EUA

² Applied Biosystems, Branchburg, Nova Jersey, EUA

³ Applied Biosystems, Foster city, Califórnia, EUA

Quadro 4.7 Reagentes utilizados no qPCR para norovírus genogrupo II.

Reagentes	Volume (µL)
H ₂ O DNase/RNase livre ¹	3,875
Taq Man [®] Universal PCR Master MIX ²	12,5
Iniciador COG 2F (10µM) ³	1,5
Iniciador COG 2R (10µM) ³	1,5
Sonda Ring 2 (10µM) ³	0,625
cDNA	5,0
Total	25,0

¹ Gibco[®], Califórnia, EUA

² Applied Biosystems, Branchburg, Nova Jersey, EUA

³ Applied Biosystems, Foster city, Califórnia, EUA

4.5.6 Reação em cadeia pela polimerase qualitativa

Moléculas molde de RNAs das partículas virais de NV GII recuperadas das amostras de alimentos, foram extraídas com o kit QIAamp Viral RNA Mini Kit[®] (Qiagen, Inc., Valencia, Califórnia, EUA) e foram utilizadas para a síntese do cDNA com a utilização de um iniciador randômico, conforme descrito no item 4.5.1.

Para detecção qualitativa de NV, empregou-se um protocolo de RT-PCR previamente descrito, que utiliza quatro iniciadores para detecção simultânea de NV GI e GII (Beuret et al, 2002).

Resumidamente, em um tubo de 0,5mL, tipo Eppendorf[®], foram adicionados 5µL de cDNA e 20µL da mistura de reagentes (Quadro 4.8). Os tubos foram incubados em Termociclador (Termocicler Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA – modelo 2400) e as amostras submetidas inicialmente à desnaturação de 94°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 60°C por 1 minuto. Um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos foi realizado e a reação mantida à temperatura de 4°C por até 24horas.

Quadro 4.8 Reagentes utilizados na PCR para amplificação de norovírus GII.

Reagentes	Concentração	Volume (μL)
H ₂ O livre de DNase/RNase (Invitrogen [®])	-	14,1
Tampão de PCR sem MgCl ₂ (Invitrogen [®])	10X	2,5
dntp: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Invitrogen [®])	2,5 mM	2,0
MgCl ₂ (Invitrogen [®])	50 mM	0,8
Taq DNA polimerase platinum (Invitrogen [®])	5 U/ μL	0,3
Mistura de iniciadores Mon 431 – 432 – 433 – 434	100 μM	0,3
Total	-	25,0

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese (100V por 1 hora) em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen[®]) utilizando-se cuba Horizon 11.14 9 Life Technologies[®] em tampão TBE 1X (Invitrogen[®]) pH 8,4. Dez microlitros do produto da reação e 2 μL do corante azul de bromofenol (Invitrogen[®]) foram aplicados em cada orifício do gel. Como referência para o tamanho do “amplicon” foi utilizado um padrão de massa molecular de 100pb (Invitrogen[®]). Após submersão do gel por 20 minutos em solução de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de brometo de etídio (Sigma Chemical Company[®]) os “amplicons” foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Labnet[®]). A imagem foi registrada em sistema de captura de imagem “BioImaging Systems[®]” utilizando o programa Labworks 4.0. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram “amplicon” de 213pb.

4.6 Padronização de Método de Recuperação e Concentração de Norovírus Genogrupo II em Alimentos

4.6.1 Queijo tipo “minas”

Inóculos de 50 μL de suspensão fecal de NV GII contendo aproximadamente 10⁶/ μL de partículas virais e suas diluições seriadas na base 10

foram semeados na superfície de quinze gramas de queijo tipo “minas” fresco. Um controle negativo foi inoculado com PBS estéril, pH 7,2 e todos os testes foram realizados em duplicata. Após a secagem das amostras (30 minutos), estas foram acondicionadas em um saco estéril onde foram adicionados 135mL de PBS, pH 7,2 para trituração do alimento utilizando o equipamento Stomacher[®] (Seward, Fisher Scientific, Sainte-Foy, Quebec, Canadá) em uma velocidade normal por 2 minutos. A seguir o sobrenadante foi removido e homogeneizado com 70mL do solvente “Ozone-Safe” Vertrel XF[®] (Fluke, Steinheim, Suíça) durante 15 minutos sob agitação, utilizando-se o agitador magnético. Após centrifugação a 5000 x g por 15 minutos a 4°C, a porção aquosa superior (aproximadamente 120mL) foi retirada para concentração dos vírus inoculados.

As partículas virais presentes nas amostras foram concentradas pelo método de adsorção-eluição utilizando membranas negativamente carregadas, conforme descrito por Katayama e colaboradores (2002) e detalhado na figura 4.1. O método foi adaptado para pequenos volumes (aproximadamente 120mL), utilizando filtro Stericup[®] (250mL) com membrana de 0,45µM, (Nihon, Millipore, EUA). Na sequência foi realizada ultrafiltração, utilizando Centriprep[®] Concentrador 50 (Nihon, Millipore, EUA), para obtenção de volume final de 2mL.

4.6.2 Alface

Inóculos de 50µL de suspensão fecal de NV GII contendo aproximadamente 10⁶/µL de partículas virais e suas diluições seriadas na base 10 foram semeados na superfície da folha de vinte e cinco gramas de alface.

Todas as etapas seguintes foram realizadas como descrito no item 4.6.1, com exceção da etapa de clarificação com Vertrel XF[®], que foi excluída do procedimento (Figura 4.1).

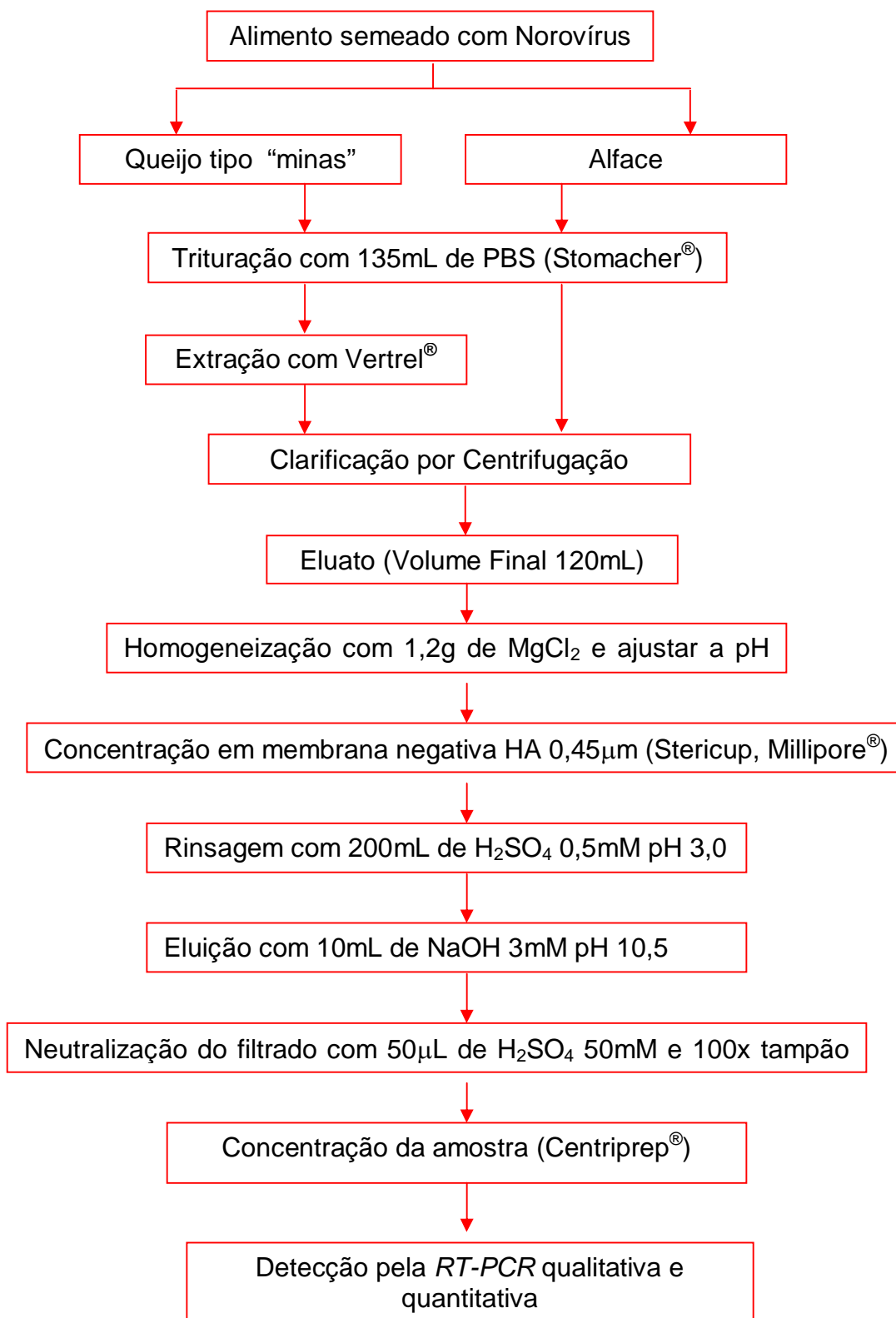
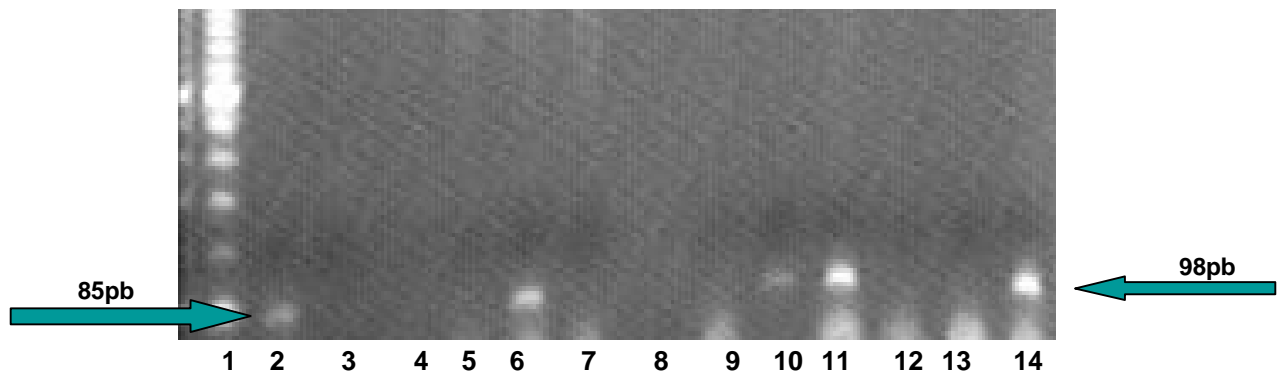


Figura 4.1 Fluxograma de recuperação, concentração e detecção de norovírus em amostras de alimentos.

5. RESULTADOS

5.1 Amplificação, clonagem e obtenção de plasmídeos recombinantes para quantificação de norovírus genogrupos I e II.

A figura 5.1 mostra o resultado da *PCR* para as amostras protótipos de NV GI e GII, utilizando iniciadores específicos (GI: COG1R e 1F; GII: COG2R e 2F). Para cada genogrupo de NV, uma banda foi visualizada no gel conforme o tamanho molecular esperado (GI: 85pb; GII: 98pb).

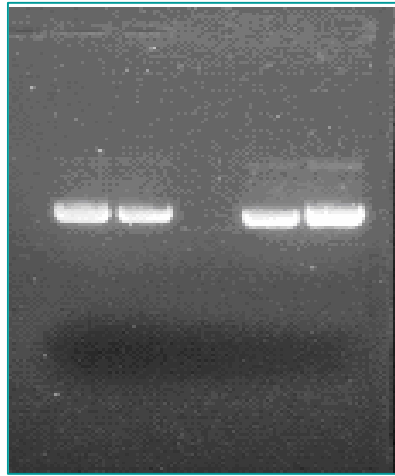


Legenda: Linha 1: PM de 100pb; linhas 2 e 6: amostras de NV GI; linhas 3 e 7: controle negativo; linhas 9, 12 e 13: amostras negativas; linhas 10, 11 e 14: amostras de NV GII.

Figura 5.1 Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos de *PCR* correspondente ao fragmento da junção das regiões de leitura aberta 1 e 2 de norovírus GI e GII

Após a ligação de cada fragmento amplificado ao vetor plasmidial *PCR 2.0* Topo (Invitrogen[®]), seguida de transformação de células Top 10 e plaqueamento bacteriano, as colônias foram selecionadas para crescimento pela inabilidade de degradar a lactose do meio, possivelmente, contendo o inserto de interesse. A purificação dos *DNAs* plasmidiais das colônias selecionadas, contendo o inserto de NV genogrupo I (dados não demonstrados) e o inserto de NV genogrupo II (Figura 5.2), pelo kit comercial Miniprep Purification System[®] (Promega

Corporation, Madison, Wisconsin, EUA), foram visualizados por eletroforese em gel de agarose.

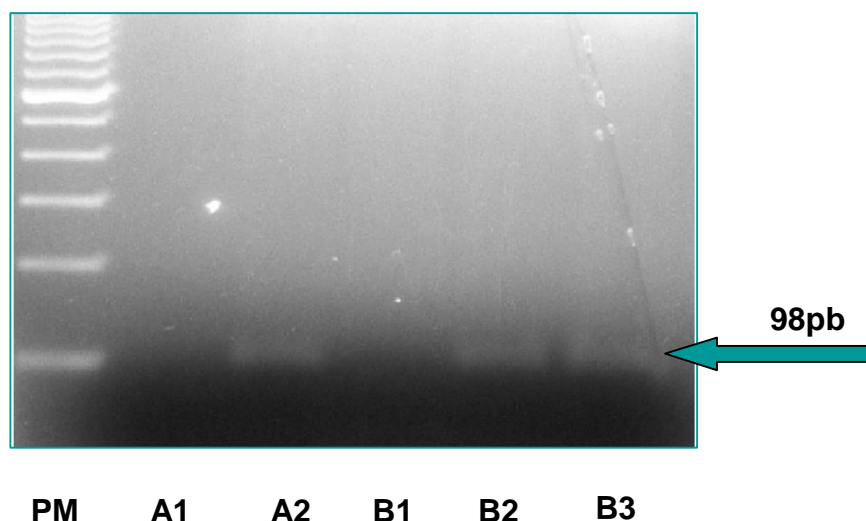


A1 B1 B2 B3 B4

Legenda: A1, B1, B2, B3 e B4 plasmídios obtidos de colônias bacterianas transformadas.

Figura 5.2 Eletroforese em gel de agarose dos DNAs plasmidiais recombinantes após a purificação utilizando o kit comercial Miniprep[®]

A presença do inserto foi confirmada pela reação de digestão do plasmídio purificado com a endonuclease de restrição *Eco* RI. Após a digestão, os insertos de NV GI e GII foram visualizados em gel de agarose, e apresentaram banda na altura correspondente ao fragmento clonado do genoma de NV. O inserto de NV genogrupo I, clonado e digerido apresentou banda na altura de 85pb (dados não demonstrados) e o inserto de NV genogrupo II, apresentou banda na altura de 98pb (Figura 5.3).

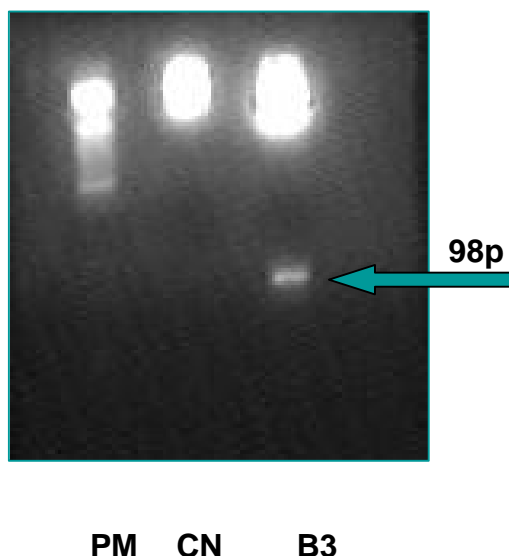


Legenda: PM: Peso molecular de 100 pares de base; A2, B2 e B3: fragmento de NV GII.

Figura 5.3 Eletroforese em gel de agarose apresentando o inserto de norovírus genogrupo II após a reação do produto purificado com a enzima de restrição *Eco* RI.

Uma colônia bacteriana que apresentou plasmídeo recombinante com o inserto de NV GI e uma colônia que apresentou plasmídeo recombinante com o inserto de NV GII foi semeada em 400mL de meio LB, para obtenção de maior massa plasmidial. Após a purificação com o kit *Maxiprep Purification System*[®] (Promega Corporation, Madison, Wiconsin, EUA), e digestão com a endonuclease de restrição *Eco* RI, os insertos de cada genogrupo foram visualizados em gel de agarose. Para o inserto de NV GI foi visualizado uma banda de *DNA* na altura de 85pb (dados não demonstrados) e para o inserto de NV GII uma banda de *DNA* na altura de 98pb (Figura 5.4).

Os nucleotídeos dos insertos de NV GII clonado e amplificado por *PCR* conforme item 4.5.1, foram seqüenciados e por alinhamento utilizando o programa Blast, apresentaram 98% de similaridade com NV GII (U07611).



Legenda: PM: Peso molecular de 100 pares de base; CN: controle negativo; B3: plasmídeo digerido pela endonuclease *Eco* RI contendo inserto de NV GII.

Figura 5.4 Eletroforese em gel de agarose do produto de digestão do plasmídeo da colônia B3 após purificação com o kit Maxiprep utilizando a endonuclease de restrição *Eco* RI.

5.2 Padronização da RT-PCR quantitativa para norovírus GI e GII

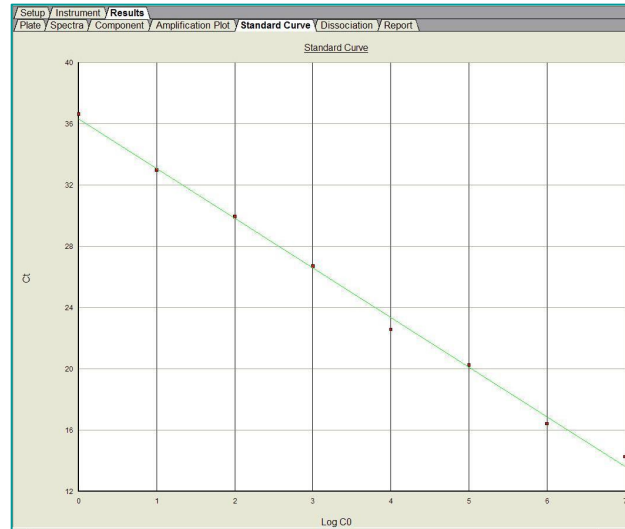
Após a obtenção e quantificação dos plasmídios recombinantes, contendo os insertos com a sequência dos fragmentos alvo do genoma de NV GI e GII, realizou-se a padronização dos qPCRs. A quantificação dos plasmídios recombinantes para cada genótipo foi de aproximadamente 5×10^{10} cópias/ μ L. Os protocolos apresentados foram resultantes da otimização das concentrações dos iniciadores e das sondas para cada uma das reações.

Para ambos os genótipos GI e GII o qPCR apresentou limite de detecção de 5 cópias de genoma viral por reação.

Para o GI, a curva padrão obtida apresentou coeficiente de regressão linear (R_2) de 0,997 e “slope” de -3,24. Para o GII, a curva padrão apresentou R_2 de 0,993 e “slope” de -3,73. Para cada reação foi utilizada uma nova curva com os padrões

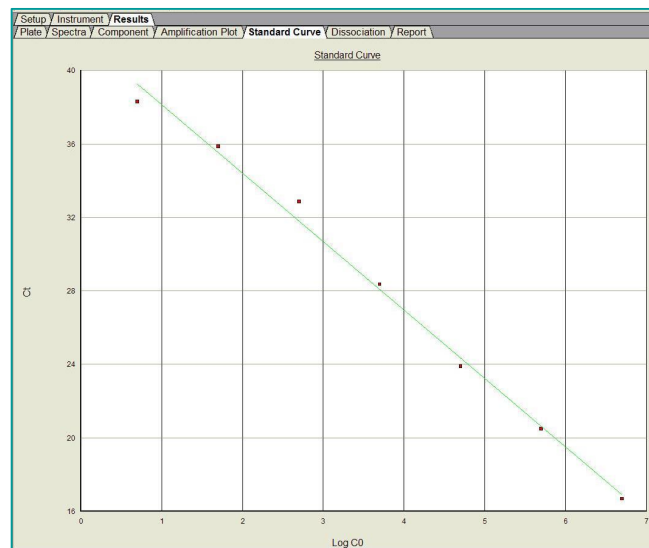
variando de 5×10^6 a 5×10^0 cópias, aliquotados e estocados a temperatura de -70°C para aferição de cada teste realizado (Figura 5.5).

A) Norovírus genogrupo I



Eixo X: Log da concentração do plasmídio (5×10^0 a 5×10^6 cópias/reacção) Eixo Y: Ct (ciclo inicial de detecção da amostra)

B) Norovírus genogrupo II



Eixo X: Log da concentração do plasmídeo (5×10^0 a 5×10^6 cópias/reacção) Eixo Y: Ct (ciclo inicial de detecção da amostra)

Figura 5.5 Gráfico ilustrativo da curva padrão utilizada na reação em cadeia pela polimerase quantitativa obtida de diluições seriadas do plasmídeo recombinante com o inserto de norovírus.

As suspensões fecais de NV GI e GII apresentaram número de Ct e quantificação frente à curva padrão estabelecida, demonstrando a especificidade de cada metodologia. As demais suspensões analisadas (RV, AdV, AstV) e os controles negativos apresentaram Ct indeterminado em ambos os qPCR (GI e GII).

A análise pelo qPCR GII das 50 amostras de suspensões fecais provenientes do surto de NV ocorrido no interior do Rio de Janeiro, apresentaram 100% de concordância com os resultados obtidos pela metodologia de RT-PCR convencional (região B) previamente utilizada (33 amostras positivas e 17 negativas). As amostras quantificadas apresentaram títulos variando de $5,5 \times 10^4$ a $4,6 \times 10^9$ cópias de RNA de NV GII por grama de fezes. O relato deste surto e os resultados obtidos com o qPCR foram previamente publicados (Ferreira et al, 2008) (Anexo 1).

5.3 Padronização do método de recuperação viral em amostras de alimento

A tabela 5.1 apresenta os resultados de percentagem de recuperação viral em amostras de alface e queijo branco tipo “minas”, testados pelo método de TaqMan padronizado nesse estudo. Os percentuais de recuperação de NV GII para amostras de alface e queijo tipo “minas”, variaram de 5,2 - 72,3%, com uma média de 34,9% e de 6,0 - 56,3% com uma média de 23,8%, respectivamente.

A RT-PCR qualitativa detectou NV nas diluições de 10^0 a 10^{-2} nos concentrados das amostras de alface. Para os concentrados das amostras de queijo não foram observados “amplicons” na altura do fragmento esperado (213pb). Em adição, foram observados grande número de produtos inespecíficos.

Tabela 5.1 Recuperação do genoma de norovírus em amostras de queijo tipo “minas” e alface pela *RT-PCR* e *qRT-PCR*.

Amostra de alimento	Diluição	Número de cópias inoculadas em 50µL de suspensão fecal (x10 ⁴)	Número de cópias recuperadas em 2mL de concentrado (x10 ⁴)	Porcentagem de recuperação (%)
Alface	10 ⁰	1913,24	99,25	5,2
	10 ⁻¹	180,27	15,00	8,3
	10 ⁻²	4,45	3,22	72,3
	10 ⁻³	0,95	0,51	53,7
Queijo	10 ⁰	1504,66	90,27	6,0
	10 ⁻¹	168,25	15,32	9,1
	10 ⁻²	4,12	2,32	56,3
	10 ⁻³	0,89	Neg	-

6. DISCUSSÃO

A importância dos alimentos como veículos de transmissão viral está se tornando amplamente reconhecida, com implicação de uma grande variedade de produtos alimentares na origem de surtos de gastroenterites (Le Guyader et al, 2004; Guévremont et al, 2006). Os NV têm sido freqüentemente associados a esses surtos pela detecção viral em espécimes clínicos e pela epidemiologia que relaciona os pacientes com a ingestão de determinado alimento. Atualmente, a aplicação de metodologias moleculares tem permitido a detecção dos vírus diretamente em amostras de alimentos, determinando a origem da contaminação por meio de “impressões digitais” moleculares (Gerba, 2006).

Os resultados obtidos com as amostras clínicas testadas pelos métodos quantitativos estabelecidos (GI e GII) comprovaram a especificidade pela detecção exclusiva de seus respectivos genogrupos. A indisponibilidade de amostras positivas para GI não permitiu a realização de ensaios comparativos para se determinar a sensibilidade do método em amostras clínicas.

O *qPCR* para NV GII estabelecido neste estudo pôde detectar e quantificar a excreção de NV em indivíduos durante um surto ocorrido na Região do Médio Paraíba, Rio de Janeiro. O mesmo percentual de detecção 33/50 (66%) foi obtido pelo *qPCR* e pelo *PCR* convencional (Ferreira et al, 2008). A vantagem do *qPCR* é a quantificação de partículas em tempo real e a não manipulação de “amplicons” pós reação, sendo de execução rápida e com menor risco de contaminação.

O método quantitativo descrito por Kageyama e colaboradores (2003) tem como região alvo de amplificação no genoma a junção da RLA-1 com a RLA-2, descrita como sendo a região mais conservada do genoma dos NV. A amplificação de regiões conservadas em ambos os *PCRs* minimizam os resultados falsos negativos causados pela diversidade genética destes vírus, ampliando a possibilidade de detecção dos diferentes genótipos.

O *qPCR* para NV GII tem sido empregado no LVC para o diagnóstico de NV em esclarecimento de surtos, assim como tem sido utilizado para avaliação de

eficiência de métodos de recuperação de NV em diferentes matrizes aquáticas (Victoria, manuscrito em preparação).

Neste estudo, o estabelecimento da *qPCR* para NV GII permitiu a avaliação da eficiência do método para recuperação e concentração destes vírus, a partir de diferentes matrizes alimentares. A *RT-PCR* em tempo real tem sido descrito como um dos métodos mais promissores de detecção viral, devido a sua rapidez, sensibilidade, especificidade e fornecimento de dados quantitativos (Shan et al, 2005).

Dois tipos de alimentos que compõe a dieta da população brasileira foram utilizados para padronização de método de recuperação de NV em alimentos: a) queijo tipo “minas”, representando os derivados do leite, contendo alto percentual de lipídeos em sua composição; b) alface, representando as verduras. O queijo tipo “minas” comercializado no país, pode ser obtido a partir de produções caseiras, que eventualmente podem não atender às boas práticas de produção, ou por fabricação industrial, existindo sempre a possibilidade de contaminação humana durante a produção.

Queijo e alface são consumidos em sanduíches, que são reconhecidos como uma das principais fontes de infecção gastroentérica por NV (Daniels et al, 2000). Esses dois tipos de alimentos são geralmente consumidos sem cozimento, podendo ser contaminados durante o preparo por manipuladores infectados, apresentando ou não sintomatologia clínica da doença (Schwab et al, 2000, Le Guyader, 2004). A alface, por apresentar folhas de grande superfície, tem a contaminação facilitada durante o processo de irrigação com água contaminada e/ou contaminação cruzada por fômites contaminados (Le Guyader et al, 2004). A contaminação do queijo e da alface, pela semeadura de vírus na superfície, teve como objetivo mimetizar um modo natural de contaminação.

Estudos epidemiológicos e laboratoriais confirmaram os NV como agente etiológico de surtos de gastroenterite viral apontando a contaminação de saladas, pelo manipulador, como fonte da infecção, reforçando o papel deste tipo de alimento como potencial veículo de transmissão destes vírus (Parashar et al, 1998; Anderson et al, 2001).

A metodologia de detecção quantitativa estabelecida nesse estudo foi associada a um protocolo de eluição/concentração para estabelecimento de um método eficiente para recuperação desses vírus nas diferentes matrizes alimentares. Na etapa inicial deste estudo, um dos métodos descrito por Schwab e colaboradores (2000) foi utilizado para recuperação de NV em ricota (resultados não demonstrados). O método que utiliza lavagem da matriz e extração do RNA com Trizol LS[®] não apresentou resultados satisfatórios. O outro método descrito, que utilizava eluição viral da matriz em PBS, clarificação com solvente polihalogenado e concentração das partículas virais com polietileno glicol (PEG) foi modificado. Neste estudo a etapa de concentração por PEG foi substituída por filtração em membrana negativamente carregada seguida de eluição com solventes inorgânicos e ultrafiltração (Centriprep Concentrator[®] 50), obtendo um volume final de 2mL. A disponibilidade no laboratório deste sistema de filtração aliada ao sucesso obtido com esta metodologia para recuperação de vírus entéricos a partir de amostras de águas fluviais (Miagostovich et al, 2008) estimulou o uso deste método fácil e rápido para recuperação de NV em alimentos.

O método desenvolvido neste estudo detectou o genoma de NV nas amostras de queijo e alface com uma taxa de recuperação semelhante a estudos anteriores utilizando a técnica quantitativa como método molecular de detecção (Rutjes et al, 2006; Butot et al, 2007). Poucos estudos utilizaram o qPCR para detecção de vírus entéricos (NV e HAV) em matrizes alimentares (Shan et al, 2005; Boxman et al, 2006; Butot et al, 2007; Dubois et al, 2007). O protocolo de qPCR padronizado (Kageyama et al, 2003) utiliza iniciadores degenerados, o que permite a detecção de diferentes genótipos de NV, portanto sendo uma ferramenta útil no esclarecimento de surtos de origem alimentar. A associação de metodologia de recuperação à um protocolo de detecção cujos iniciadores foram desenhados para a detecção de uma cepa específica de NV (cepa Valleta) (Butot et al, 2007) pode inviabilizar a detecção do ensaio na pesquisa destes agentes para esclarecimento de surtos.

Os resultados da taxa de recuperação apresentados na tabela 5.1 demonstraram que o elevado número de cópias virais na suspensão fecal utilizada para semear as amostras de alimentos pode ter interferido na eficiência de recuperação, como demonstrado pelo maior percentual obtido quando se utilizou concentrações virais mais baixas, principalmente nas amostras de queijo. O elevado percentual de recuperação de NV no queijo sugere que a etapa de clarificação utilizando Vertrel XF[®] tenha sido eficiente para a remoção dos inibidores orgânicos presentes, embora “amplicons” inespecíficos ainda tenham sido observados na reação de *PCR* convencional. Em contrapartida, esta etapa pode ter contribuído para a redução das partículas virais explicando a menor sensibilidade de detecção do método quando comparado com os resultados obtidos com a alface.

Para as amostras de alface, o *qPCR* demonstrou uma maior sensibilidade analítica quando comparado com a técnica convencional, uma vez que na diluição 10^{-3} não foi possível amplificar cópias do genoma de NV pela técnica de *RT-PCR* convencional.

A utilização do QIAamp viral *RNA* mini kit[®] (Qiagen, Valencia, CA, USA) foi determinada previamente por um estudo comparativo utilizando diferentes métodos de extração de *RNA* genômico. O método de extração com Trizol[®] não apresentou resultados satisfatórios e o método de extração com sílica (Boom et al, 1990) apresentou resultados similares aos obtidos com kit comercial, embora tenha se observado a presença de “amplicons” inespecíficos (dados não demonstrados). Butot e colaboradores (2007), avaliando o QIAamp viral *RNA* mini kit[®] em relação ao kit de extração Nuclisens magnético Kit[®] (BioMérieux) demonstraram que o primeiro foi capaz de detectar NV, HAV e RV, enquanto que com a utilização do kit da BioMérieux não foi possível a detecção de RV. O presente estudo utilizou o NV na padronização de metodologia de recuperação e detecção de vírus diretamente de matriz alimentar, porém outros vírus entéricos podem vir a ser objeto de pesquisa pela aplicação desta mesma metodologia, incluindo a metodologia de extração do genoma pelo QIAamp viral *RNA* mini kit[®].

A trituração dos alimentos com o aparelho Stomacher[®] possibilita a detecção de vírus presentes tanto na superfície como no interior das amostras, demonstrando que o método padronizado pode ser aplicável para a detecção viral neste tipo de evento. Um novo mecanismo de contaminação viral foi proposto experimentalmente pela demonstração de partículas de HAV no interior das células do tecido de cebolas verdes (Chancellor et al, 2006). Futuras investigações serão necessárias para confirmação desta via de contaminação o que implicará nos métodos empregados para recuperação e concentração dos vírus em alimentos. No caso específico da contaminação de queijo tipo “minas” durante a fabricação, as partículas virais poderão estar presentes no interior deste produto.

O desenvolvimento de um método simples e sensível para recuperação de patógenos virais em alimentos facilitará estudos de ocorrência destes vírus em surtos de gastroenterite de origem alimentar. Estudos esses que são úteis na avaliação de riscos e também para o desenvolvimento de guias para servir como orientações de segurança alimentar, que irá ajudar as autoridades sanitárias a traçar a via de contaminação ao longo de toda a cadeia de consumo e com isso investigar uma possível fonte comum de contaminação viral (Goyal, 2006).

No Brasil e na maioria dos países em desenvolvimento não existe nenhum estudo relativo aos agentes patogênicos virais relacionados com surtos de gastroenterites de origem alimentar. Também, poucos laboratórios são preparados para detectar, por técnicas moleculares sensíveis, e aplicar uma vigilância epidemiológica ativa que defina o real papel dos NV no cenário das infecções gastroentéricas. Com a ausência de procedimentos para recuperação viral em amostras alimentares, torna-se cada vez mais urgente o desenvolvimento e aplicação de metodologias para detecção viral direta nestas amostras.

Inicialmente, a grande maioria dos métodos de detecção a partir de alimentos descreve a recuperação de NV a partir de moluscos bivalves (Traore et al, 1998; Mullendore et al, 2001; Kingsley & Richards, 2001; Le Guyader et al, 2003; Schultz et al, 2007). Entretanto, na última década uma variedade de métodos desenvolvidos para recuperação de NV a partir de matrizes alimentares

mais complexas como frutas, hortaliças e cebolas verdes têm sido descritos (Schwab et al, 2000; Dubois et al, 2002; Sair et al, 2002; Le Guyader et al, 2004; Rzezutka et al, 2005; Boxman et al, 2006; Guévremont et al, 2006; Rutjes et al, 2006). Estes métodos utilizam eluição alcalina em tampão glicina ou em PBS, associada à precipitação com PEG, ultracentrifugação ou filtros carregados positivamente para concentração viral. A eficiência de recuperação viral obtida neste estudo não pôde ser avaliada comparativamente com a maioria dos métodos descritos, uma vez que estes utilizaram unidades de *RT-PCR* para esta avaliação (Dubois et al, 2002; Le Guyader et al, 2004; Guévremont et al, 2006; Rutjes et al, 2006). Rutjes e colaboradores (2006) descreveram uma perda de 10^1 a 10^3 unidades de *PCR*, nos três diferentes métodos testados para recuperação de calicivírus canino em alface.

Butot e colaboradores (2007) desenvolvendo uma metodologia de recuperação viral com eluição alcalina e ultrafiltração, utilizando alface como uma das matrizes, apresentou eficiência de recuperação de 43,9%, similar a obtida pelo método desenvolvido neste estudo.

O aumento do número de notificações de surtos alimentares correspondem não só ao aumento do consumo de frutas e vegetais frescos, à expansão geográfica das fontes de distribuição desses produtos durante as últimas décadas, assim como uma maior vigilância dos agentes patogênicos relacionados com estes surtos. Como exemplo da dispersão dos NV por alimentos, pode ser citado a ocorrência de surtos de gastroenterite entre funcionários de uma rede de concessionárias de automóveis. A distribuição de alimentos a partir da concessionária de Nova Iorque, EUA, para outras situadas em 13 estados do país resultou na notificação de casos da doença. NV foi detectado pela *RT-PCR* em 32 de 59 amostras de fezes em oito estados e as seqüências nucleotídicas idênticas confirmaram uma fonte comum de infecção. A análise epidemiológica associou essa infecção ao consumo de saladas servidas por esta concessionária (Anderson et al, 2001).

Em outros surtos de gastroenterite, envolvendo o consumo de presunto (Texas, EUA) e ostras (Bari, Itália), a confirmação da infecção por NV foi obtida

pela detecção direta destes vírus nos alimentos e nos espécimes clínicos dos indivíduos envolvidos. A caracterização molecular por sequenciamento nucleotídico, demonstrou a relação entre os genótipos detectados, confirmando os alimentos como fonte primária da infecção (Daniels et al, 2000; Prato et al, 2004). Estes estudos demonstram o importante papel dos alimentos como causadores de surtos de gastroenterite por NV, principalmente pela ingestão de alimentos crus que requerem manipulação antes do consumo.

A metodologia desenvolvida neste estudo é resultante da associação do protocolo que utiliza uma etapa de clarificação com solvente para retirada de componentes lipídicos da amostra (Schwab et al, 2000) com o método de eluição/concentração descrito para concentração de vírus a partir de amostras de água (Katayama et al, 2002). Esta metodologia abre novas perspectivas para o estudo de alimentos como veículo de transmissão e propagação viral em surtos de gastroenterites, destacando a importância destes como fonte de infecção primária, principalmente nos países em desenvolvimento. Poderá contribuir também para o controle microbiológico de alimentos, fornecendo base laboratorial para vigilância sanitária e epidemiológica destas infecções.

7 CONCLUSÕES

- A metodologia de *qPCR* estabelecido para NV GI e GII mostrou ser eficiente para detecção e quantificação destes vírus, com sensibilidade de detecção de até cinco cópias de genoma por reação para ambos os genogrupos;
- O *qPCR* em tempo real estabelecido mostrou-se eficiente para detecção e quantificação de NV em amostras clínicas, corroborando com os resultados com o *PCR* qualitativo;
- O método de recuperação viral em alface apresentou percentagem de recuperação variando de 5,2 a 72,3%;
- O método de recuperação viral em queijo apresentou percentagem de recuperação variando de 6,0 a 56,3%;
- A ausência de inibição na metodologia utilizada, corrobora resultados anteriores que demonstram a eficiência do Vertrel XF[®] na remoção de lipídeos, a utilização de solventes inorgânicos para a eluição/concentração viral no processo de recuperação e a combinação desses métodos com a detecção pelo *qPCR*.
- O método de recuperação e concentração de NV desenvolvido durante o estudo, se mostrou eficiente para detecção de vírus em queijo e alface podendo ser utilizado como ferramenta no esclarecimento de surtos de NV pela pesquisa direta destes vírus em tais matrizes.

8 PERSPECTIVAS

O estabelecimento de protocolos de recuperação e detecção de NV diretamente em amostras de alimentos abre novas perspectivas para realização de estudos epidemiológicos que tem como objetivo determinar o papel destes vírus nos surtos de gastroenterite de origem alimentar, sendo uma ferramenta útil para os laboratórios que realizam pesquisa e vigilância de NV.

Esta metodologia poderá ser empregada na avaliação de recuperação de outros vírus entéricos a partir destas e/ou de outras matrizes alimentares.

9 BIBLIOGRAFIA

Anderson AD, Garrett VD, Sobel J, Monroe SS, Fankhauser RL, Schwab KJ, Bresee JS, Mead PS, Higgins C, Campana J, Glass RI; Outbreak Investigation Team. Multistate outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis associated with a common caterer. *Am J Epidemiol.* 2001; 154:1013-9.

Ando T, Jin Q, Gentsch JR. Epidemiologic applications of novel molecular methods to detect and differentiate small round structured viruses (Norwalk-like). *J Med Virol.* 1995; 47:145-152.

Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *J Infect Dis.* 2000; 181: S336-48.

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of non cultivatable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(1): 15-37.

Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect.* 2004; 58(1): 42-9.

Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, Hammer C, Garfield M, Green KY. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol.* 2003; 77(20): 10957-74.

Belliot G, Sosnovtsev SV, Chang KO, Babu V, Uche U, Arnold JJ, Cameron CE, Green KY. Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of *RNA*-dependent *RNA* polymerase. *J Virol.* 2005; 79 (4):2393-403.

Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol.* 2003; 77(21): 11603-15.

Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Lüthi TM. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 1925-1931.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noorda AJ. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 495-503.

Borges AM, Teixeira JM, Costa PS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco Rde C, Brito WM, Leite JPG, Cardoso DD. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101: 721-24.

Boxman IL, Tilburg JJ, Te Loeke NA., Vennema H, Jonker K, de Boer E, Koopmans M. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int J Food Microbiol.* 2006; 108, 391-396.

Bresee JS, Widdowson MA, Monroe SS, Glass RI. Foodborne viral gastroenteritis: challenges and opportunities. *Clin Infect Dis.* 2002; 35, 748-753.

Butot S, Putallaz T, Sánchez G. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73, 186-92.

Cardoso DDP, Borges AMT. Calicivírus Humanos. *Rev Pat Trop.* 2005; 34(1): 17-26.

Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinje J, Racz ML. Genetic diversity of Norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo State, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 3947-53.

Caul EO, Appeltont H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *J Med Virol.* 1982; 9: 257-265.

Centers for Disease Control and Prevention. "Norwalk-like viruses:" public health consequences and outbreak management. *MMWR* 2001; 50 (No. RR-9).

Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus Outbreak Among Evacuees from Hurricane Katrina – Houston, Texas, September 2005. *MMWR* 2005; 54, 1016-1018.

Chancellor DDS, Tyagi MC, Bazaco S, Bacvinskas MB, Chancellor VM, Dato and F de Miguel. Green onions: potential mechanism for hepatitis A contamination. *J Food Prot.* 2006; 69:1468–1472.

Daniels NA, Bergmire-Sweat DA, Schwab KJ. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular trace back to deli sandwiches contaminated during preparation. *J Infect Dis.* 2000; 181:1467-1470.

De Leon R, Matsui SM, Baric RS. Detection of Norwalk virus in stool specimens by transcriptase-polymerase chain reaction and non radioactive oligoprobes. *J Clin Microbiol.* 1992; 30:151-3157.

Dedman D, Laurichesse H, Caul EO, Wall PG. Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales, 1990-5. *Epidemiol Infect.* 1998; 121(1): 139-49.

Dentinger CM, Bower WA, Nainan OV, Cotter SM, Myers G, Dubusky LM, Fowler S, Salehi ED, Bell BP. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *J Infect Dis.* 2001 Apr 15; 183(8):1273-6.

Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN. Human enteric Caliciviridae: The complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *J Gen Virol.* 1995; 76: 2349-2355.

Doane FW. Electron microscopy for the detection of gastroenteritis viruses. In: Kapikian AZ, editor. *Viral Infection of the gastrointestinal tract.* New York: Marcel Dekker 1994; 101-31.

Dubois E, Agier C, Traore O, Hennechart C, Merle G, Cruciere C, Laveran H. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *J Food Prot.* 2002; 65, 1962-1969.

Dubois E, Hennechart C, Merle G, Burger C, Hmila N, Ruelle S, Perelle S, Ferré V. Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: characterization of the method performances. *Int J Food Microbiol.* 2007; 117(2):141-9.

Estes MK, Ball JM, Guerrero RA, Opekun AR, Gilger MA, Pacheco SS. Norwalk virus vaccines: Challenges and progress. *J Infect Dis.* 2000; 181(Suppl 2): S367–S373.

Estes MK, Prasad BV, Atmar RL. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr Opin Infect Dis.* 2006; 19(5):467-74.

Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 1998; 178: 1571–1578.

Fankhauser RL, Monroe SS., Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD. Epidemiological and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 2002; 186: 1-7.

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.* 2008; 80(2):338-44.

Gerba, PC, 2006. Food Virology: Past, Present, and Future. In: Goyal, S.M. (Ed.), *Viruses in Food*. Springer Science+Business Media, LLC 2006, New York, pp. 01-04.

Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee JS, Monroe SS. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis.* 2000; 181 (Suppl2): S254-61.

Glass RI, Bhan MK, Ray P, Bahl R, Parashar UD, Greenberg H, Rao CD, Bhandari N, Maldonado Y, Ward RL, Bernstein DI, Gentsch JR. Development of candidate rotavirus vaccines derived from neonatal strains in India. *J Infect Dis.* 2005; 192 Suppl 1:S1-5.

Goyal SM, 2006. Conventional Methods of Viruses Detection in Foods. In: Goyal, S.M. (Ed.), *Viruses in Food*. Springer Science+Business Media, LLC 2006, New York, pp. 101-114.

Graham DY, Jiang X, Tanaka T. Norwalk virus infection of volunteers: New insights based on improved assays. *J Infect Dis.* 1994; 70: 34-43.

Green J, Gallimore CI, Norcott JP. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for diagnosis of SRSV- associated gastroenteritis. *J Med Virol.* 1995; 47: 392-398.

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.* 2000; 181 (Suppl 2): S322-30.

Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. Human Caliciviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. (Eds.). *Fields in Virology.* Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 4th (ed.) Vol. 1, p. 841-874, 2001.

Green KY. Caliciviridae: The Noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM (Eds.). *Fields in Virology.* Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 5th (ed.) Vol. 1, p. 949-979, 2007.

Greenberg HB, Valdesuso J, Yolken RH, Gangarosa E, Gary W, Wyatt RG, Konno T, Suzuki H, Chanock RM, Kapikian AZ. Role of Norwalk virus in outbreaks of nonbacterial gastroenteritis. *J Infect Dis.* 1979; 139(5): 564-8.

Guévremont E, Brassard J, Houde A, Simard C, Trottier YL. Development of an extraction and concentration procedure and comparison of RT-PCR primer systems for the detection of hepatitis A virus and norovirus GII in green onions. *J Virol Methods.* 2006; 134, 130-135.

Gutiérrez-Escolano AL, Vázquez-Ochoa M, Escobar-Herrera J, Hernández-Acosta J. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 21; 311:759-66.

Hale AD, Tanaka TN, Kitamoto N. Identification of an epitope common to genogroup I “Norwalk-like viruses”. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1656-1660.

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

Hedberg CW, Osterholm MT. Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6:199-210.

Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, Yoshikawa M, Kato N, Okabe N. Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. *J Infect Dis.* 2000; 181, Suppl 2:S270-4.

Jiang X, Graham DY, Wang K, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science.* 1990; 250: 1580-1583.

Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of Norwalk virus capsid protein. *J Virol.* 1992; 66: 6527-32.

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

Jiang X, Wilton W, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, Barrett E, Guerrero M, Ruiz-Palacios G, Green KY, Hale AD, Estes MK, Pickering LK, Matson DO. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *J Infect Dis.* 2000; 181: 349-359.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2003; 41, 1548-1557.

Kapikian AZ. Norwalk and Norwalk-like viruses. In: Kapikian A.Z., ed. Virus Infections of the Gastrointestinal Tract. New York: Marcel Dekker, 1994; 471-518.

Kapikian AZ. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. J Infect Dis. 2000; 181 Suppl 2:S295-302.

Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, Singh N, Schonberger LB, Feldman R, Greenberg HB. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and role of Norwalk virus in outbreaks of acute gastroenteritis. Ann Inter Med. 1982; 96: 756-761.

Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. Appl Environ Microbiol. 2002; 68, 1033-1039.

Keswick BH, Satterwhite TK, Johnson PC. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. Appl Environ Microbiol. 1985; 50: 261-264

Kingsley DH, Richards GP. Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. Appl Environ Microbiol. 2001; 67: 4152-7.

Koopmans M, Vinjé J, de Wit M, Leenen I, van der Poel W, van Duynhoven Y. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. J Infect Dis. 2000; 181, 262-269.

Koopmans M, Vinjé J, Duizer E, de Wit M, van Duynhoven Y. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. Novartis Found Symp. 2001; 238: 197-214

Koopmans M, von Bonsdorff CH, Vinjé J, de Medici D, Monroe S. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev.* 2002; 26, 187-205.

Koopmans M, Vennema H, Heersma H, van Strien E, van Duynhoven Y, Brown D, Reacher M, Lopman B; European Consortium on Foodborne Viruses. Early identification of common-source foodborne virus outbreaks in Europe. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:1136-42.

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

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

Le Guyader FS, Neill FH, Dubois E, Bon F, Loisy F, Kohli E, Pommepuy M, Atmar RL. A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *Int J Food Microbiol.* 2003; 87(1-2):107-12.

Le Guyader FS, Schultz AC, Haugarreau L, Croci L, Maunula L, Duizer E, Lodder-Verschuur F, von Bonsdorff CH, Suffredini E, van der Poel WM, Reymundo R, Koopmans M. Round-robin comparison of methods for the detection of human enteric viruses in lettuce. *J Food Prot.* 2004; 67, 2315-2319.

Lopman BA, Brown DW, Koopmans M. Human calicivirus in Europe. *J Clin Virol.* 2002; 24: 137-160.

Lopman BA, Reacher MH, Van Duynhoven Y, Hanon FX, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jan; 9(1):90-6.

Lund F, Lindqvist R. Virus in food and drinking water in Sweden – Norovirus and Hepatitis A virus. National Food Administration, Sweden, 2004. Rapport

Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NVL) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect.* 2000; 124: 481-7.

Matsuno S, Sawada R, Kimura K, Suzuki H, Yamanishi S, Shinozaki K, Sugieda M, Hasegawa A. Sequence analysis of SRSV in fecal specimens from an epidemic of infantile gastroenteritis, October to December 1995, Japan. *J Med Virol.* 1997; 52: 377-80

Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol.* 2002; 147(8): 1655-63.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5, 607-625.

Miagostovich MP, Ferreira FF, Guimarães FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SL, Silva LA, Leite JP. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74:375-82.

Mishiro S. Recent topics on hepatitis E virus: emerging, zoonotic, and animal-to-human transmission in Japan. *Uirusu.* 2004; 54(2): 243-8.

Moreno-Espinosa S, Farkas T, Jiang X. Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2004; 15: 237-45.

Mullendore JL, Sobsey MD, Shieh YC. Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters. *J Virol Methods.* 2001; 94(1-2): 25-35.

Murata T, Katsushima N, Mizuta K, Muraki Y, Hongo S, Matsuzaki Y. Prolonged norovirus shedding in infants \leq 6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J*. 2007; 26 (1):46-9.

Nicollier-Jamot B, Ogier A, Piroth L, Pothier P, Kohli E. Recombinant virus-like particles of a norovirus (genogroup II strain) administered intranasally and orally with mucosal adjuvants LT and LT(R192G) in BALB/c mice induce specific humoral and cellular Th1/Th2-like immune responses. *Vaccine*. 2004; 22(9-10): 1079-86.

Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, Estes MK, Seto Y, Monroe SS, Glass RI. Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *J Med Virol*. 1997; 53: 372-83.

O' ryan ML, Mamani N, Gaggero A, Avendano LF, Prieto S, Pena A, Jiang X, Matson DO. Human caliciviruses are a significant pathogen of acute sporadic diarrhea in children of Santiago, Chile. *J Infect Dis*. 2000; 182: 1519-22.

Okhuysen PC, Jiang X, Ye L, Johnson PC, Estes MK. Viral shedding and fecal IgA response after Norwalk virus infection. *J Infect Dis*. 1995; 171(3):566-9.

Okitsu-Negishi S, Nguyen TA, Phan TG. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. *Pediatr Int*. 2004; 46: 245-252.

Pang XL, Honma S, Nakata S, Vesikari T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis*. 2000; 181(suppl 2): 288-294.

Parashar UD, Dow L, Fankhauser RL. An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: Implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiol Infect.* 1998; 121: 615-621.

Parashar UD, Monroe SS. "Norwalk-like viruses" as a cause of foodborne disease outbreaks. *Rev Med Virol.* 2001; 11(4): 243-52.

Parashar UD, Bresee JS, Glass RI. The global burden of diarrhoeal disease in children. *Bull World Health Organ.* 2003; 81: 236.

Parashar UD, Li JF, Cama R, Dezaia M, Monroe SS, Taylor DN, Figueroa D, Gilman RH, Glass RI. Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. *J Infect Dis.* 2004; 190: 1088-92.

Parks CG, Moe CL, Rhodes D, Lima A, Barrett L, Tseng F, Baric R, Talal A, Guerrant R. Genomic diversity of "Norwalk like viruses" (NLVs): pediatric infections in a Brazilian shantytown. *J Med Virol.* 1999; 58: 426-34.

Ponka A, Maunula L, Von Bonsdorff CH, Lyytikainen O. Outbreak of calicivirus gastroenteritis associated with eating frozen raspberries. *Euro surveillance.* 1999; 4: 66-69.

Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science.* 1999; 286 (5438): 287-90.

Prato R, Lopalco PL, Chironna M, Barbuti G, Germinario C, Quarto M. Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in south Italy. *BMC Infect Dis.* 2004; 21: 4-37.

Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, Miagostovich MP, Spano LC. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103: 201-6.

Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, Cotterill H, Ratcliffe S, Jenkins M, Appleton H, Gallimore CI, Gray JJ, & Brown DW. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol*. 2003; 108 (26): 109-115.

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

Roda de Husman AM, Lodder-Verschoor F, van den Berg HH, Le Guyader FS, van Pelt H, van der Poel WH, Rutjes SA. Rapid virus detection procedure for molecular tracing of shellfish associated with disease outbreaks. *J Food Prot*. 2007; 70(4): 967-74.

Rutjes SA, Lodder-Verschoor F, van der Poel WH, van Duijnhoven YT, de Roda Husman AM. Detection of noroviruses in foods: a study on virus extraction procedures in foods implicated in outbreaks of human gastroenteritis. *J Food Prot*. 2006; 69: 1949-1956.

Rzezutka A, Alotaibi M, D'Agostino M, Cook N. A centrifugation-based method for extraction of norovirus from raspberries. *J Food Prot*. 2005; 68:1923-5.

Sair AI, D'Souza DH, Moe CL, Jaykus LA. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *J Virol Methods*. 2002; 100: 57-69.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniats D. *Molecular Cloning: laboratory manual*. 3^a ed. Nova York: Cold Spring Haroor laboratory Press, Cold Spring Haroor, 2001.

Schultz AC, Saadbye P, Hoorfar J, Nørrung B. Comparison of methods for detection of norovirus in oysters. *Inter J Food Microbiol.* 2007; 114: 352-356.

Schwab KJ, Neill FH, Fankhauser RL, Daniels NA, Monroe SS, Bergmire-Sweat DA, Estes MK, Atmar RL. Development of Methods to Detect “Norowalk-Like Viruses” (NLVs) and Hepatitis A Virus in Delicatessen Foods: Application to a Food-Borne NLV Outbreak. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 213-218.

Shan XC, Wolffs P, Griffiths MW. Rapid and quantitative detection of hepatitis A virus from green onion and strawberry rinses by use of real-time reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 5624-6.

Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MC, Maranhão AG, Rocha LN, Ramírez ML, Monroe SS, Glass RI, Gentsch J. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13:1244-6.

Straub TM, Höner ZU, Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer Bk, Bartholomew RA, Valdez CO, Bruckner-Lea CJ, Gerba CP, Abbaszadegan M, Nickerson CA. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 396-403.

Tacket CO. Plant-derived vaccines against diarrhoeal diseases. *Vaccine.* 2005; 23: 1866-9.

Tei S, Kitajima N, Ohara S, Inoue Y, Miki M, Yamatani T, Yamabe H, Mishiro S, Kinoshita Y. Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol.* 2004; 74:67-70.

The World Health Report 2005. World Health Organization [online]. 2005. [capturado 10 dic. 2005]. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2005/en/>.

Thornton AC, Jennings- Conklin KS, McCormick MI. Norovirus: Agents in outbreaks of acute gastroenteritis. Disaster Manag Response. 2004; 2(1): 4-9.

Traore O, Arnal C, Mignotte B, Maul A, Laveran H, Billaudel S, Schwartzbrod L. Reverse transcriptase *PCR* detection of astrovirus, hepatitis A virus, and poliovirus in experimentally contaminated mussels: comparison of several extraction and concentration methods. Appl Environ Microbiol. 1998; 64: 3118-22.

Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, Ando T, Glass RI, Monroe SS. Use of TaqMan real-time reverse transcription-*PCR* for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. J Clin Microbiol. 2006; 44: 1405 - 42.

Vainio K, Myrmet M. Molecular Epidemiology of Norovirus Outbreaks in Norway during 2000 to 2005 and Comparison of Four Norovirus Real-Time Reverse Transcriptase *PCR* Assays. J Clin Microbiol. 2006; 44: 3695-3702.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JPG, Miagostovich MP. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. 2007; J Pediatr Infect Dis. vol 26: 1-5.

Vidal R, Solari V, Mamani N, Jiang X, Vollaire J, Roessler P, Prado V, Matson DO, O'Ryan ML. Caliciviruses and foodborne gastroenteritis, Chile. Emerg Infect Dis. 2005; 11: 1134-7.

Vinje J, Hamidjaja RA, Sobey MD. Development and amplification of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription *PCR* assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. J Virol Methods. 2004; 15, 116: 109-17.

Vinje J, Koopmans MP. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis.* 1996; 174: 610-615.

Yamazaki K, Oseto M, Seto Y. Reverse transcription-polymerase chain reaction detection and sequence analysis of small round-structured viruses in Japan. *Arch Virol.* 1996; 12: 271-276.

Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.* 2003; 9: 247-62.

Wright PJ, Gunsekere IC, Doultree JC, Marshall JA. Small round-structured (Norwalk-like) viruses and classical human caliciviruses in southeastern Australia, 1980-1996. *J Med Virol.* 1998; 55:312-20.

Zahorsky J. Hiperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr.* 1929; 46: 391-395.

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

10 ANEXOS

**A RAPID PROCEDURE FOR DETECTING NOROVIRUSES FROM CHEESE
AND FRESH LETTUCE**

Tulio Machado Fumian¹, José Paulo G. Leite¹, Victor Augustus Marin², Marize Pereira Miagostovich^{1*}

¹Laboratory of Comparative Virology, Oswaldo Cruz Institute, ²National Institute of Quality Control in Health, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

*Correspondence to: Marize Pereira Miagostovich, Laboratório de Virologia Comparada, Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, Avenida Brasil 4.365 – Manguinhos – CEP 21040-360 – Rio de Janeiro – RJ – Brazil. Phone/fax: 55 21 2560 2921.
E-mail: marizepm@ioc.fiocruz.br

Key words: Norovirus; Food-borne; Taqman; Cheese; Lettuce

Abstract

Noroviruses (NoVs) are the most widely recognized agents of outbreaks of food-borne viral gastroenteritis and the efficiency of different protocols to recovery NoV from food matrix have been tested in several laboratories worldwide. The goal of this study was to develop a rapid and sensitive method for NoV recovery by using a filtration concentration method associated to an amplification protocol of RT-PCR to detect NoVs from cheese and fresh lettuce. Experimentally, fecal suspension containing different number of NoVs copies was spiked in the food surface and extracted by a direct elution using a Stomacher[®] apparatus. An Ozone-Safe solvent Vertrel XF[®] treatment was included for cheese samples for cleaning particulate matter. The watery phase was collected and the viral concentration was performed by the adsorption-elution method using negatively charged membranes with inorganic solvents in a Stericup[®] and afterward ultra filtrated using a Centriprep Concentrator[®] 50 to obtain a final volume of 2 ml. RNA isolation was performed by using the commercially available QIAamp Viral RNA Mini Kit[®] and the reverse transcription carried out with pd(N6) random primer. Real time quantitative RT-PCR (TaqMan[®]) and conventional RT-PCR were used for NoVs molecular detection. The rate recovery percentage of NoV ranged from 5.2 to 72.3% in lettuce and from 6.0 to 56.3% in cheese. Our results revealed this method as a suitable one to detect viral contamination of food and will help established the cause and source of NoVs outbreaks of food-borne illness.

1. Introduction

Gastroenteritis remains one of the most common causes of morbidity and mortality worldwide. The impact of the disease is most dramatic in developing countries, where are calculate 1.8 million death/year in children up to 5 years old, being estimates that a large number of these deaths are caused by food-borne pathogens (Bresee et al., 2002). Despite much recent attention given to the prevention of infections caused by bacterial agents, viral pathogens have become more important in the last decade. Among viruses, NoVs were responsible for more than 65% of all food-borne illness caused by known pathogens in the United States and a greater part of it in the world, and their importance has increased worldwide (Mead et al., 1999; Koopmans et al., 2002; Koopmans and Duizer, 2004).

Human NoVs are members of the *Norovirus* genus and with *Sapovirus* genus comprise the group of human caliciviruses in the *Caliciviridae* family. They are nonenveloped, positive-sense single-stranded RNA viruses (ssRNA) and NoVs are further classified into five distinct genogroups (G) and 29 genotypes based on phylogenetic analyses of the capsid gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>; Zheng et al., 2006). Human NoVs are mainly recovered among GI, II and IV, being the GII the most prevalent among cases of NoV infections and food-borne infections (Koopmans et al., 2000; Guévremont et al., 2006).

The majority of food-borne infections are originated from a fecal-oral contact and transmission occurs in two ways (Guévremont et al., 2006). A primary contamination, when food materials are already contaminated before they are

harvested, e.g. shellfish grown in contaminated waters or soft fruits irrigated/sprayed with contaminated water. A secondary contamination occurs at harvest or during processing and emphasizes the role of the food handler preparing foods for others with whom he/she does not come into direct contact. Contamination from these persons involves not only viruses transfer from infected persons but also the use of polluted water or materials in processing (Koopmans and Duizer, 2004; Carter, 2005). Poor personal hygiene of infected food handlers provides one of the major routes for viral contamination and ready-to-eat and prepared foods such as salads, sandwiches and bakery items are frequently associated with outbreaks of viral food-borne disease (Kuritsky et al., 1984; Daniels et al., 2000; Leggitt et al., 2000). Although viral food-borne contamination is a significant problem, direct virus identification on food samples has rarely been achieved. The lack of sensitive and reliable methods to detect viral pathogens on food samples, mainly due to the presence of inhibitors and low number of viral particles, has made experimental confirmation of viral food-borne outbreaks difficult (Le Guyader et al., 2004; Butot et al., 2007).

The aim of this study was to standardize a new methodology for NoVs recovery and concentration from fresh cheese and fresh lettuce by using negatively charged membranes as adsorption-elution method associated with a quantitative amplification protocol, TaqMan[®].

2. Materials and Methods

2.1. Real time PCR standard curve and viral titration

A prototype NoV GII strain kindly provided by Dr. Christopher Gallimore (Enteric Virus Unit, Virus Reference Department, Centre for Infections, Health Protection Agency, Colindale, London, United Kingdom) was used to construct the standard curve (SC) in the quantitative assay. To prepare the human NoV cDNA standard, an amplicon was generated with a set of primers COG2R and COG2F, derived from the highly conserved ORF1-ORF2 junction region (Kageyama et al., 2003). The amplified product (97 bp in length), was separated on a 1% low melting-point agarose gel, purified with the QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) and cloned into the pCR[®] 2.1-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Bae et al., 2002). The target sequence in the plasmid was analyzed by digestion with the restriction endonuclease *EcoRI* and subsequent DNA sequencing. DNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and the copy number was estimated based on the size. The plasmid was used to generate a SC for estimation of NoV RNA in fecal specimens. The quantity (copies/ μ l) of cDNA standard was calculated according to the following formula (Yin et al., 2001): $\text{copies}/\mu\text{l} = (6.022 \times 10^{23} \times C [\text{g}/\mu\text{l}]) / (\text{molecular weight})$, where molecular weight of the NoV cDNA standard is $(\text{base pairs} \times 6.58 \times 10^2)$. Final values for absolute levels of viral genome are given as copies/reaction of the cDNA standard. A NoV GII-specific SC was generated by a 10-fold serial dilution (5×10^6 to 5×10^0 copies per reaction) of purified NoV GII cDNA plasmid.

2.2. Stool sample

A positive NoV GII stool sample (GenBank accession no. **DQ997040**) from a patient was used for spiking experiments. The stool sample was examined for NoV using a reverse transcription (RT) followed by a polymerase chain reaction (PCR) as described by Beuret et al. (2002) and the molecular investigation was performed by using a set of degenerated primers that target a relatively conserved region at the 3'-end of the major capsid gene (region D) (Vinjé et al., 2004).

The titer of the NoV 10% (W/V) fecal suspension used for spiking experiments was established with real time RT-PCR methodology using the SC described previously and the NoV titer was used as absolute number of NoV genome copies/ μ l of fecal suspension.

2.3. Recovery and concentration of NoV from food samples

Fifteen and twenty five grams of fresh “Minas” cheese and fresh lettuce, respectively, obtained from local commercial sources were seeded by direct application of 50 μ l of a NoV fecal suspension or fecal suspension dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) on the food surface. A negative control was inoculated with sterile PBS, pH 7.2, only. The same method for viral recovery from food samples was used, however for cheese, an additional step to remove the lipids was introduced (Figure 1). For the “Minas” cheese samples, a method adapted from Schwab et al. (2000) was used, in which 135 ml of PBS, pH 7.2, was added to the virus seeded food samples and placed into a stomacher bag. The sample was mixed in a Stomacher[®] apparatus (Seward, Fisher Scientific, Sainte-Foy, Quebec, Canada) at a normal velocity for 2 min. The supernatant was removed and mixed with 70 ml of an Ozone-Safe solvent Vertrel XF[®] (Fluke, Steinheim, Switzerland) for 15 min and centrifuged at 5.000 X g for 15 min at 4 °C. The upper layer (approximately 120 ml)

was removed and retained for virus concentration. For fresh lettuce samples, the same method described previously without the Vertrel XF[®] step was used (Figure 1). After mixing in the Stomacher[®] and clarified by centrifugation the supernatant was collected for viral concentration.

The viral particles present in the samples were concentrated by the adsorption-elution method using negatively charged membranes as described previously with the addition of an acid rinse (H₂SO₄, 5 mM, pH 3.0) step for the removal of cations (Katayama *et al.*, 2002). Prior to process filtration, a final concentration of 25 mM of MgCl₂ was adjusted in the solution obtained from the recovery stage, and the method was adapted for small volumes (approximately 120 ml), using the 0.45 µm membrane Stericup[®] filter (250 ml) (Nihon, Millipore, USA), following an ultra filtration using a Centriprep Concentrator[®] 50 (Nihon, Millipore, USA) to obtain a final volume of 2 ml. All experiments were performed in duplicate (independent experiments) for each dilution.

2.4. Viral RNA extraction and reverse transcription (RT) reaction from seeded food samples

The ssRNA was extracted from 140 µl of the concentrated viral material with a QIAamp viral RNA kit[®] (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNAs were eluted with 60 µl of AVE buffer and kept at -70 °C until used in RT reaction. Complementary DNA (cDNA) was obtained by reverse transcription using random primer (Pd(N)₆, 50 A₂₆₀ units, Amersham Biosciences[®], Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK). Briefly, 2 µl of dimethylsulfoxide (Sigma[®], St., USA) and 10 µl of ssRNA were mixed, heated at 97 °C for 7 min and chilled on ice for 2 min. For a 50 µl RT reaction, the mixture of

components and their final concentrations were: 250 µM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP) (Gibco, BRL), 2.5 mM MgCl₂, 200 U of Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen[®], USA) and 1 µl of Pd(N)₆ random primer. The RT reaction mixture was incubated in a thermal cycler (PTC-200[®], MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) at 42 °C for 1 hour and 95 °C for 10 min.

2.5. Noroviruses detection

Real-time RT-PCR and conventional RT-PCR were used for NoV molecular detection. Real-time RT-PCR to detect human NoV cDNA was performed as described by Kageyama et al. (2003). Their protocol was adapted to the ABI 7500 (Applied Biosystems[®], CA, USA) and performed using 5 µl of cDNA, 12.5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems[®], CA, USA), 600 and 250 nM concentration of each primer and probe, respectively, in a final mixture reaction volume of 25 µl, under the following conditions: incubation at 50 °C for 2 min to activate UNG, initial denaturation at 95 °C for 10 min, and then 45 cycles of amplification with denaturation at 95 °C for 15 s and annealing and extension at 56 °C for 1 min. Amplification data were collected and analyzed with Sequence Detector software version 1.6 (Applied Biosystems[®], CA, USA). In each operation, a NoV GII-specific standard curve was generated by a 10-fold serial dilution (5 x 10⁶ to 5 x 10⁰ copies per reaction) of purified NoV GII cDNA plasmid.

A conventional RT-PCR based on degenerate primers of region B (Beuret et al., 2002) within 3'-end of ORF1 (RNA polymerase) was used for NoV screening in food samples and the results were compared with those obtained with real time RT-PCR. The reaction was performed according to the following conditions:

denaturation for 3 min at 94 °C, 40 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 50 °C, 1 min at 72 °C and a final extension for 10 min at 72 °C.

For all molecular procedures, four separate rooms were used to avoid cross contamination of samples. Specific NoV GI positive fecal sample previously tested and milli-Q water were used as positive and negative controls, respectively, in all procedures.

3. Results and Discussion

The importance of food transmission in gastroenteritis outbreaks is becoming more widely recognized and a range of different types of food products can be involved as vehicles for viral agents (Le Guyader et al., 2004; Guévremont et al., 2006). In developed countries, where exist a monitoring of pathogens related to food-borne gastroenteritis outbreaks, NoV is frequently associated, through mainly by viral detection in patients fecal samples and from epidemiological data, but the direct viral detection on food samples is rare, showing that methods for detection viruses in non-shellfish foods are in their early phase and needs more improvements. The primary means of identifying viruses as cause of food-borne outbreaks has been through the recognition of a common viral pathogen in consumers and the use of epidemiologic methods to identify a particular food as the vector.

The majority of the methods for NoV detection are described for shellfish, and use RT-PCR associated, although recently a variety of method have been developed to recovery NoVs from complex matrix as berries, vegetables and green onions by using alkaline or PBS elution associated to polyethylene glycol (PEG) precipitation, ultracentrifugation or positively charged filters for viruses concentration (Schwab et al., 2000; Dubois et al., 2002; Sair et al., 2002; Le Guyader et al., 2004; Boxman et al., 2006; Guévremont et al., 2006; Rutjes et al., 2006; Rzezutka et al., 2006; Schultz et al., 2007).

The concentration method developed in this study is a modification of an elution-concentration methodology previously reported for virus concentration from water (Katayama et al., 2002). Our previous experience with this methodology

recovering enteric virus from river water (Miagostovich et al., 2008), stimulated the use of this easy method to detect NoVs in food, since the Millipore apparatus was available in the laboratory.

Table 1 shows the number of inoculated and the average recovered copies of NoV positive stool sample seeded and the recovery percentage of the proposed method for elution and concentration for NoVs in the food samples. The recovery percentage range from 5.2 – 72.3%, with an average of 34.9, and 6.0 – 56.3% with an average of 23.8% for lettuce and cheese samples, respectively. The rate of recovery from cheese revealed that the step used for cheese samples with Vertrel XF[®] was essential to remove the large quantity of particles of organic inhibitors present, although it could not eliminate the problem of unspecific products observed in conventional RT-PCR. For lettuce samples the quantitative technique showed a greater analytical sensitivity than the conventional molecular technique, since at the dilution 10⁻³ the conventional RT-PCR did not detect the NoV genome. The Real time RT-PCR was able to detect up to five copies of viral RNA genome in the threshold cycle (Ct) of 37.2 and the correlation between the Ct and the amount of target template was good along the SC. The SC showed a slope of -3.68 (R² = 0.99). The number of nucleic acid copies present in the fecal suspension used to estimate the percentage of recovery virus from the food samples was around 5 x 10⁶ cDNA copies per 50 µl of 10% fecal suspension.

To our knowledge there are few studies that used real time RT-PCR to detect viruses in food samples none shellfish and two of these studies detected Hepatitis A viruses (HAV) in food matrices (Shan et al., 2005; Boxman et al., 2007; Butot et al., 2007; Dubois et al., 2007). Real-time PCR is one of the most promising

detection methods due to its sensitivity, specificity, speed, and possibility to deliver quantitative data (Shan et al., 2005).

The method adapted to food was able to detect NoV in the samples with a recovery rate similar to other related studies using real time PCR (Rutjes et al., 2006; Butot et al., 2007). The quantitative RT-PCR used was described by Kageyama et al., (2003) that target the most conserved region of the NoVs genome, ORF 1 and 2 junction, having the advantage in prevent getting false negative results caused by the genetic diversity of NoVs, and the screening of almost all the GII genotypes, different of the similar assay described by Butot et al. (2007) that was designed specifically for the detection of an specific strain (Valletta strain). The use of QIAamp viral RNA mini kit[®] (Qiagen, Valencia, CA, USA) for ssRNA extraction was based in previously study (Butot et al., 2007), where the authors evaluated this RNA kit with the Nuclisens magnetic Kit[®] (bioMérieux) showing that the first one was able to detect NoV, HAV and rotaviruses (RV) and the bioMérieux kit failed to detect RV. This study was standardized for NoVs, however others gastroenteric viruses like RV, astroviruses and adenoviruses can be search, and for this reason the Qiagen kit was select as the extraction method.

In this study, two common types of food that represent part of the diet for the Brazilian population were used; lettuce representing vegetables and a cheese sample, representing milk derivatives that contain a large portion of lipids in their composition. Vegetables and ready to eat foods, like sandwiches, are recognized as the main source of infection of NoV gastroenteritis, because this type of food is generally eaten raw and may be contaminated during preparation by ill or

asymptomatic infected food handlers (Schwab et al., 2000). The idea of use fresh cheese (“Minas” type) to standardize the method is that this type of food is commonly served in snack bars and is largely consumed throughout Brazil, mainly in the southeast region. Also, this type of cheese is commonly ‘home-made’ rather than industrialized and so the possibility of human contamination during preparation of the cheese always exists.

The results of recovery rate of NoV in table 1, shows that a high number of viral particles in the fecal suspension used to seeded the food samples can reduce the rate of NoVs recovery, mainly in the cheese samples; however, in the other hand, because of this food sample have an additional step, the Vertrel XF[®] extract, and it is possible that the loses of NoV particles can be greater along the methodology, and this can explain why the latest dilution (10^{-3}) was not detect in cheese samples and could be detected for the lettuce sample.

The development of a simple and sensitive method to recover viral pathogens from foods will facilitate prevalence studies that are useful in risk assessment and for developing food safety guidelines and will help the health authorities to trace the contamination pathway along the whole consumption chain and to investigate, in case that exist, a possible common source of viral contamination (Goyal, 2006). In addition few laboratories are able to monitoring with molecular sensitive techniques the really role of NoVs in the scenario of the gastroenteric disease taking into account the food-borne transmission as a cause of viral gastroenteritis outbreaks.

This rapid procedure based on a negatively charged membrane filtration for detecting NoV can contribute with the search of food-borne viruses in laboratories

that have been using this approach to virus detection in water samples by the fact that it is one more tool for laboratory surveillance. It opens up new horizons for the study of foods as a vehicle of transmission and viral propagation in outbreaks of gastroenteritis and highlights the importance of foods as the source of primary infection of viral contamination, mainly in developing countries.

Acknowledgments

This work was supported by the Programa Estratégico de Pesquisa em Saúde IV (PAPES IV) of the Vice-Presidência de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq –400149/2006-0). Marize P. Miagostovich and José Paulo G. Leite are fellowship of CNPq.

5. References

Bae, E.A., Han, M.J., Song, M.J., Kim, D.H., 2002. Purification of rotavirus infection-inhibitory protein from *Bifidobacterium breve* K-110. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 553–556.

Beuret, C., Kohler, D., Baumgartner, A., Lüthi, T.M., 2002. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1925-31.

Boxman, I.L., Tilburg, J.J., Te Loeke, N.A., Vennema, H., Jonker, K., de Boer, E., Koopmans, M., 2006. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Inter. J. Food Microbiol.* 108, 391-396.

Boxman, I.L., Tilburg, J.J., te Loeke, N.A., Vennema, H., de Boer, E., Koopmans, M., 2007. An efficient and rapid method for recovery of norovirus from food associated with outbreaks of gastroenteritis. *J. Food Prot.* 70, 504-508.

Butot, S., Putallaz, T., Sánchez, G., 2007. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 186-92.

Bresee, J.S., Widdowson, M.A., Monroe, S.S., Glass, R.I., 2002. Foodborne viral gastroenteritis: challenges and opportunities. *Clin. Infect. Dis.* 35, 748-753.

Carter, M.J., 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1354-1380.

Daniels, N.A., Bergmire-Sweat, D.A., Schwab, K.J., Hendricks, K.A., Reddy, S., Rowe, S.M., Fankhauser, R.L., Monroe, S.S., Atmar, R.L., Glass, R.I., Mead, P., 2000. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *J. Infect. Dis.* 181, 1467-1470.

Dubois, E., Agier, C., Traore, O., Hennechart, C., Merle, G., Cruciere, C., Laveran, H., 2002. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *J. Food Prot.* 65, 1962-1969.

Dubois, E., Hennechart, C., Merle, G., Burger, C., Hmila, N., Ruelle, S., Perelle, S., Ferré, V., 2007. Detection and quantification by real-time RT-PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: characterization of the method performances. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 141-149.

Goyal, S.M., 2006. Conventional Methods of Viruses Detection in Foods. In: Goyal, S.M. (Ed.), *Viruses in Food*. Springer Science+Business Media, LLC 2006, New York, pp. 101-114.

Guévremont, E., Brassard, J., Houde, A., Simard, C., Trottier, Y.L., 2006. Development of an extraction and concentration procedure and comparison of RT-PCR primer systems for the detection of hepatitis A virus and norovirus GII in green onions. *J. Virol. Methods* 134, 130-135.

Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K., 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1548-1557.

Katayama, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S., 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1033-1039.

Koopmans, M., Vinjé, J., de Wit, M., Leenen, I., van der Poel, W., van Duynhoven, Y., 2000. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. *J. Infect. Dis.* 181, 262-269.

Koopmans, M., von Bonsdorff, C.H., Vinjé, J., de Medici, D., Monroe, S., 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol. Reviews* 26, 187-205.

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

Kuritsky, J.N., Osterholm, M.T., Greenberg, H.B., Korlath, J.A., Godes, J.R., Hedberg, C.W., Forfang, J.C., Kapikian, A.Z., McCullough, J.C., White, K.E., 1984. Norwalk gastroenteritis: a community outbreak associated with bakery product consumption. *Ann. Intern. Med.* 100, 519-521.

Le Guyader, F.S., Schultz, A.C., Haugarreau, L., Croci, L., Maunula, L., Duizer, E., Lodder-Verschoor, F., von Bonsdorff, C.H., Suffredini, E., van der Poel, W.M., Reymundo, R., Koopmans, M., 2004. Round-robin comparison of methods for the detection of human enteric viruses in lettuce. *J. Food Prot.* 67, 2315-2319.

Leggitt, P.R., Jaykus, L.A., 2000. Detection methods for human enteric viruses in representative foods. *J. Food Prot.* 63, 1738-1744.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607-625.

Miagostovich M.P., Ferreira F.F., Guimarães F.R., Fumian T.M., Diniz-Mendes L., Luz S.L., Silva L.A., Leite J.P., 2008. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 375-82.

Rutjes, S.A., Lodder-Verschoor, F., van der Poel, W.H., van Duynhoven, Y.T., de Roda Husman, A.M., 2006. Detection of noroviruses in foods: a study on virus

extraction procedures in foods implicated in outbreaks of human gastroenteritis. *J. Food Prot.* 69, 1949-1956.

Rzeżutka, A., D'Agostino, M., Cook, N., 2006. An ultracentrifugation-based approach to the detection of hepatitis A virus in soft fruits. *Inter. J. Food Microbiol.* 108, 315-320.

Sair, A.I., D'Souza, D.H., Moe, C.L., Jaykus, L.A., 2002. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 100, 57-69.

Schultz, A.C., Saadbye, P., Hoorfar, J., Nørrung, B., 2007. Comparison of methods for detection of norovirus in oysters. *Inter. J. Food Microbiol.* 114, 352-356.

Schwab, K.J., Neill, F.H., Fankhauser, R.L., Daniels, N.A., Monroe, S.S., Bergmire-Sweat, D.A., Estes, M.K., Atmar, R.L., 2000. Development of Methods to Detect "Norowalk-Like Viruses" (NLVs) and Hepatitis A Virus in Delicatessen Foods: Application to a Food-Borne NLV Outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 213-218.

Shan, X.C., Wolfs, P., Griffiths, M.W., 2005. Rapid and quantitative detection of hepatitis A virus from green onion and strawberry rinses by use of real-time reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5624-6.

Vinje, J., Hamidjaja, R.A., Sobsey, M.D., 2004. 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.

Yin, J.L., Shackel, N.A., Zekry, A., McGuinness, P.H., Richards, C., Putten, K.V., McCaughan, G.W., Eris, J.M., Bishop, G.A., 2001. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol. Cell Biol.* 79, 213-221.

Zheng, D.P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312-323.

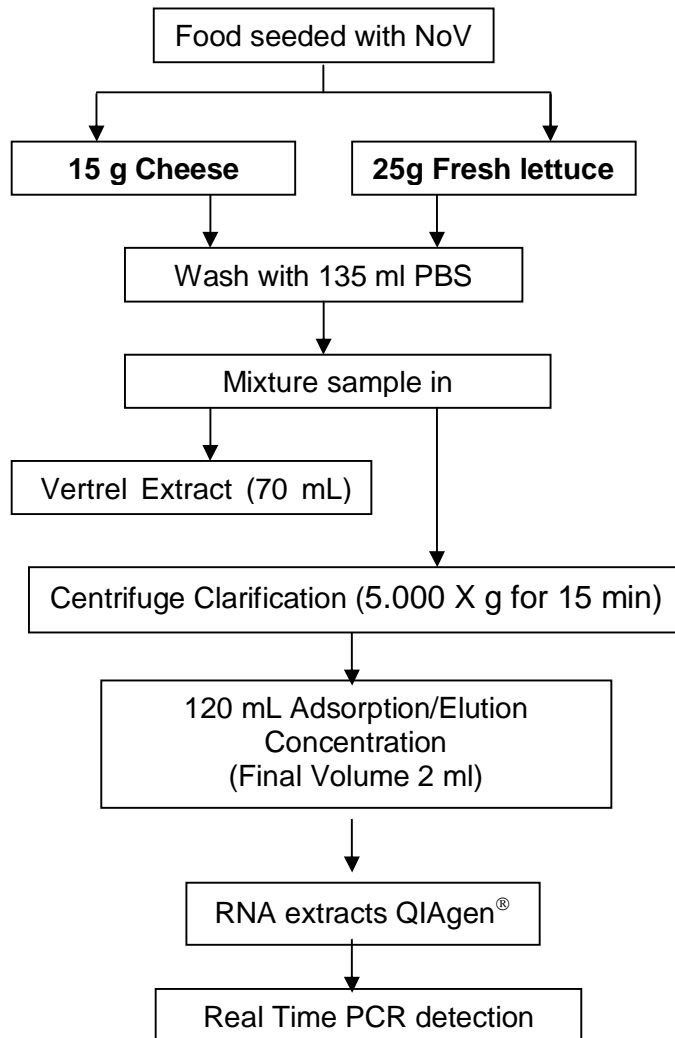


Figure 1: Flow diagram used for recovery, concentration and detection of NoV in foods.

Food Sample	Dilutions	Number of inoculated copies in 50µl of fecal suspension (x10 ⁴)	Number of recovery copies in 2 ml of concentrate (x10 ⁴)	Percentage of recovery (%)
Lettuce	10 ⁰	1913.24	99.25	5.2
	10 ¹	180.27	15.00	8.3
	10 ²	4.45	3.22	72.3
	10 ³	0.95	0.51	53.7
Cheese	10 ⁰	1504.66	90.27	6.0
	10 ¹	168.25	15.32	9.1
	10 ²	4.12	2.32	56.3
	10 ³	0.89	neg	-

Table 1: Noroviruses recovery from seeded food samples by using real time TaqMan RT-PCR.

ACUTE GASTROENTERITIS CASES ASSOCIATED WITH NOROVIRUSES INFECTION IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO

Ferreira, MSR¹; Xavier MPTP¹; Fumian, TM¹; Victoria, M¹; Oliveira SA²; Pena, LHA³;
Leite JPG^{1*}; Miagostovich, MP¹.

¹Laboratory of Comparative Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil 21040-360.

²Faculty of Medicine, Federal Fluminense University, Niterói, RJ.

³Epidemiology Service, Secretary of Public Health, Resende, RJ.

This work was carried out at the Laboratory of Comparative Virology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*Correspondence to: José Paulo Gagliardi Leite, Laboratório de Virologia Comparada – Pavilhão Cardoso Fontes, Av. Brasil 4.365 – Manguinhos – CEP 21040-360 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil. Phone/Fax. 55 21 25602921 e-mail: jpgleite@ioc.fiocruz.br

Running head: **Noroviruses outbreaks in Rio de Janeiro**

ABSTRACT

In March 2005, the Epidemiological Surveillance Service of Resende, municipality of the Middle Paraíba Valley, State of Rio de Janeiro reported a sudden spontaneous occurrence of acute gastroenteritis cases in children in a public day care center. The follow investigation showed that children's relative were also affected presenting the same signs and symptoms as diarrhea and vomiting. Later, two municipalities, Piraí and Rio Claro, reported gastroenteritis outbreaks or sporadic cases from May to June totalizing 50 fecal samples collected during this period. Bacterial and parasitic investigation was negative in these samples. The main goal of the present study was to investigate the virus etiology in these outbreaks as well as in sporadic cases of acute gastroenteritis in State of Rio de Janeiro. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), enzyme immunoassay for adenovirus and rotavirus antigen detection (EIARA) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed to investigate the presence of the most important viruses associated with acute gastroenteritis: Group A rotaviruses (RV-A), noroviruses (NoV), astroviruses (HAstV), and adenoviruses (HAdV). RT-PCR and quantitative TaqMan real time RT-PCR detected NoV in 33 out of 50 (66%) cases studied. Partial nucleotide sequence analysis of capsid (region D) showed that the circulating strain belongs to genogroup (G) II and genetic group or genotype (GG) 4. Norovirus GII/4 was the etiological agent responsible for acute gastroenteritis outbreak studied confirming the worldwide distribution of this strain. The results revealed the importance of investigating the presence of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis, in order to implement precautions to prevent further dissemination of the infection.

INTRODUCTION

Gastroenteritis is one of the major public health problems in developing and developed countries and viruses belonging to the genus *Norovirus*, family *Caliciviridae*, are now recognized as an important cause of sporadic cases and outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in humans (Bereciartu et al., 2002; Fankhauser et al., 2002; Kroneman et al., 2006). They are small non-enveloped viruses measuring 25-35nm in diameter with plus-sense, single-strand RNA polyadenylated genome of 7.5-7.7 kb that contains three open reading frames (ORFs). ORF 1 encodes the nonstructural polyprotein that produces 6 proteins after cleavage, including the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). ORF2 and ORF3 encode the major (VP1) and minor (VP2) capsid proteins, respectively (Atmar and Estes., 2001; Green et al., 2001; Belliot et al., 2003; Bertolotti-Ciarlet et al., 2003; Gutierrez-Escolano et al., 2003). The genomic diversity of *Norovirus* includes five genogroups (GI to GV), with genogroups GI, GII and GIV associated with infections in humans. Twenty-nine genetic clusters of NoV have been identified, based on phylogenetic analysis of the complete VP1 genome sequence and distributed as follows: Eight GI, 17 GII, two GIII, one GIV, and GV (Zheng et al., 2006).

Noroviruses (NoV) have a worldwide distribution and are associated with outbreaks in hospitals, cruise ships, nursing and residential homes, and other institutional settings, with sporadic cases occurring in all age groups throughout the year (Moreno-Espinosa et al., 2004; Parashar et al., 2004; Bon et al., 2005). Person-to-person transmission by the fecal-oral route, airborne transmission and contact with contaminated surfaces are common, but transmission occurs predominantly through

the ingestion of contaminated water or food (Fankhauser et al., 2002). The infection is characterized by the acute onset of nausea, diarrhea, vomiting, and abdominal cramps (Lopman et al., 2004).

Noroviruses research, including the development of prevention and control strategies, has been hampered by the fact of these viruses have been not adequately propagate *in vitro* and by the lack of animal models that simulate infection and disease (Straub et al., 2007). Advances in diagnostic methodologies have increased through molecular detection procedures, after the cloning and sequencing of the Norwalk and Southampton viruses (Jiang et al., 1990; Lambden et al., 1995).

The importance of these agents in a developing country like Brazil has been demonstrated (Gabbay et al., 1994; Parks et al., 1999; Talal et al., 2000; Borges et al., 2006; Castilho et al., 2006), although only one retrospective study reported a NoV outbreak that occurred in a daycare center in Rio de Janeiro (Gallimore et al., 2004).

The main goal of this report is to describe the occurrence of NoV infection associated with small outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in the State of Rio de Janeiro, mainly in the Middle Paraiba Valley. In addition, the algorithm for rapid diagnosis of these infections was evaluated in a virus diagnoses laboratory contracted to diminish the high number of viral gastroenteritis cases without diagnosis and demonstrate the role of NoV in these infections.

MATERIALS AND METHODS

Study Site

Middle Paraiba Valley is one of eight political and administrative divisions of the State of Rio de Janeiro, which include 12 of the 92 municipalities in the State and 784,813 inhabitants, corresponding to 5.46% of the State's population (15,383,407). (http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/tabelagrandes_regioes21...27/03/03).

Clinical Specimens

A total of 50 fecal samples were collected from acute gastroenteritis cases that occurred during the first semester of 2005, in three different municipalities of the Middle Paraiba Valley Region: Resende, Piraí, and Rio Claro. This study is part of a global study concerning the diagnosis, surveillance and molecular epidemiology of gastroenteric viruses (group A rotaviruses [RV-A], astroviruses [HAstV], adenoviruses [HAdV] and NoV) in State of Rio de Janeiro, and was approved by the Ethical Research Committee Fiocruz (311/06).

Fecal suspensions and genome extraction

The viral genome was extracted using the glass powder method, with modifications (Boom et al., 1990), from 400µl of a 10% (w/v) fecal suspension prepared in 10mM Tris-HCl Ca⁺⁺, pH 7.2, in order to perform the following methodologies for detecting the four main agents responsible for acute viral gastroenteritis: RV-A, NoV, HAstV, and HAdV.

Rotavirus and adenovirus detection:

PAGE – Polyacrylamide gel electrophoresis was performed as previously described by Pereira et al. (1983) in order to detect dsRNA viruses.

EIARA – The enzyme immunoassay for RV-A and HAdV antigen detection (EIARA) described by Pereira et al. (1985) was performed following the manufacturer's recommendations (BioManguinhos, Fiocruz, Ministry of Health, Brazil).

RV-A (SA11) and HAdV type 2 isolated in cell culture were used as positive controls, as previously described (Pereira et al., 1985).

Reverse transcription

Complementary DNA (cDNA) was obtained by reverse transcription (RT) using random primer (PdN₆, 50 A₂₆₀ units, Amersham Biosciences, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK). Briefly, 2μL of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, St., USA) and 10μL of RNA were mixed, heated at 97°C for 7 min and chilled on ice for 2 min. For a 50μL RT reaction, the mixture components and their final concentrations were: 250μM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP) (Invitrogen[®], USA), 2.5mM MgCl₂, 200U of Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen[®], USA) and 1μL of PdN₆ random primer. The RT reaction mixture was incubated in a thermal cycler (PTC-200[®] MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) at 42°C for 1 hour and 95°C for 10 min.

Polymerase chain reaction protocols for noroviruses and astroviruses detection:

NoV and HAsV protocols were performed using a specific set of primers and thermocycling conditions described by Trujillo et al. (2006) and Noel et al. (1995),

respectively. The mixture consisted of 5µL of cDNA in a final volume of 25µL of the reaction mixture containing 10X PCR Buffer (Invitrogen[®], USA), 2.5mM MgCl₂ (Invitrogen[®], USA), 250µM dNTP (Invitrogen[®], USA) and 5 U/µL Taq DNA polymerase platinum (Invitrogen[®], USA). PCR products were resolved on 1% agarose gel electrophoresis. Samples showing a specific amplicon of 213 bp or 449 bp, like the positive controls, were considered positive for NoV or HAstV, respectively.

For molecular procedures, four separate rooms were used to avoid cross-contamination of samples. Positive fecal samples previously tested and milli-Q water (Invitrogen[®], USA) were used as a positive and negative control, respectively, in all procedures.

TaqMan Real time PCR

The primers and probe for detecting NoV GII used in this quantitative assay were previously described by Kageyama et al. (2003). Their protocol was modified, adapted to the ABI 7500 (Applied Biosystems, CA, USA) and performed using 5µL of cDNA, 12.5µL TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), 600 and 250nM concentration of each primer and probe, respectively, in a final mixture reaction volume of 25µL.

In each operation, a NoV GII-specific standard curve was generated by a 10-fold serial dilution (10^7 to 10^1 copies) of purified NoV GII cDNA plasmid. Plasmid standards containing PCR products of the ORF1-ORF2 junction were prepared with strain prototype NoV GII (P1A) gentile provided by Dr.Christopher Gallimore (Enteric Virus Unit, Virus Reference Department, Centre for Infections, Health

Protection Agency, Colindale, London, United Kingdom) with primers set COG2F and COG2R.

Polymerase chain reaction protocols for NoV sequencing

For the molecular characterization of NoV GII strain, a single PCR amplification was performed using a set of primers that target the ORF-2 fragment that encodes the VP1 capsid protein spanning nucleotide (nt) 6432 to 6684 (region D) and thermocycling conditions, as previously described by Vinjé et al. (2004). The amplicons of 253bp obtained in the PCR were purified using the QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN, CA, USA) following the manufacturer's recommendations and quantified on 1% agarose gel electrophoresis, using the Low DNA Mass Ladder (Invitrogen[®], USA) as a molecular pattern. PCR products were sequenced using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer[®] and Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1[®] (Applied Biosystems, CA, USA) in both directions using individually the same primers as in the amplification reactions. Centri-Sep[®] columns (Princeton Separations, CA, USA) were used for purification of the sequencing reaction products, according to the manufacturer's recommendations.

Phylogenetic analysis

The nucleotide (nt) sequences determined in this study were aligned and edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), deposited in the GenBank database and compared with available sequences, including reference sequences of each genotype. A phylogenetic tree was constructed using the MEGA program version 3.1 (Kumar et al., 2004) by the neighbor-joining method, with the genetic distance calculated by the Kimura 2-parameter model using 1000 pseudo-replicas.

RESULTS

Epidemiological findings

Between the 10th - 11th epidemiological week of 2005 (March 9th to March 17th), the Epidemiological Surveillance Service of the Municipality of Resende, located in the Middle Paraiba Valley of the State of Rio de Janeiro notified the occurrence of gastroenteritis cases in 12 out of 44 children attending a municipal daycare facility in the borough of Fazenda da Barra II. After investigation, it was demonstrated that on March 9th, a child experienced a severe episode of vomiting in the dining room, in the presence of the other resident children and staff members. Later, two out of 19 staff members of the daycare facility and relatives of some children suffered from vomiting and diarrhea. A second cluster of gastroenteritis cases occurred in the same period in the same borough, where another 23 cases were reported by persons not related to the daycare center, including 15 children and eight adults.

By the end of March, 40% (34/85) of the boroughs in Resende municipality had notified cases of acute gastroenteritis, presenting a total of 112 cases. Fazenda da Barra II was the most affected borough with 34 cases. In April, the municipality of Rio Claro reported another cluster of gastroenteritis cases and in the following months, new cases of the disease were reported in other municipalities of the region. In this study, a laboratorial investigation was performed on clinical samples corresponding to the first cluster of cases that occurred at the daycare facility with others from the municipalities affected afterwards.

Laboratorial diagnosis

From March to June 2005 the Laboratory of Comparative Virology at the Oswaldo Cruz Institute received 50 stool samples from acute gastroenteritis cases that occurred in three municipalities of the Middle Paraíba Valley in order to investigate the presence of viruses in these samples that were previously negative for bacterial and parasites.

All samples initially tested for the presence of RV-A was negative by PAGE and EIARA and one sample was positive for HAdV by EIARA. All 50 samples, including the HAdV positive sample, were tested by RT-PCR for the presence of NoV and HAstV. NoV amplicons were detected in 66% (33/50) of these and co infection with HAdV was observed in one sample (Table I). HAstV was detected in one stool sample from Resende. The total rate of NoV infection detected during the period studied according to the epidemiological information from each municipality ranged from 54.5% to 81.8%. The age group distribution of the positive cases ranged from <1 to 65 years old with 60.7% (20/33) of cases occurring in children under 10 years-old (Figure 1).

Table II shows that diarrhea was the only clinical symptom reported in 100% of the cases studied. Among the 33 NoV positive cases confirmed by RT-PCR, the following were the main symptoms observed: vomiting (n=19, 57.5%), abdominal pain (n=14, 42.4%) and fever ($\geq 37.5^{\circ}$ C) (n=13, 39.4%). Dehydration, the presence of mucus in the stools, rash and respiratory symptoms were observed in children under nine years-old. No patient positive for NoV infection reported having bloody stools.

Detection of Taq Man Real time PCR

Taq Man Real time PCR specific for GII was performed in order to evaluate the use of a rapid assay for detecting and quantification of NoV fecal samples. A standard curve with 10-fold serial dilutions of NoV GII standard plasmid (from 10^7 to 10^1) was generated. A detection limit of 10 copies per reaction mixture was observed in the standard curve for a threshold cycle (Ct) value of 36.88. All 50 fecal samples were tested by TaqMan and the results obtained revealed NoV GII infection in all 33 samples previously positive by conventional RT-PCR (region B), showing a 100% agreement between the results using both methodologies. The quantitative results obtained using TaqMan Real time PCR were evaluated according to number of days with diarrhea. The number of copies ranged from 2.6×10^1 to 2.2×10^6 in the reaction tube and corresponded to about 5.5×10^4 to 4.6×10^9 copies of NoV RNA per g of fecal sample suspension (Table III).

Sequencing analysis

In order to determine the genotype of GII in circulation, partial DNA sequencing of PCR amplicons (region D) of NoV strains was performed on four samples selected to represent each municipality. The strains displayed a maximum of 0.02% of nt sequence divergence and no aminoacid (aa) sequence divergence between each other and the phylogenetic aa analysis confirmed that all strains belonged to GII/4 (Figure 2).

DISCUSSION

Mainly in response to the impact of RV-A infection worldwide, routine laboratory diagnosis of nonbacterial gastroenteritis now investigates the presence of this virus in fecal sample suspensions by detecting dsRNA using PAGE and/or antigen by enzymatic immunoassays (EIA), which also provide adenovirus antigen detection (Pereira et al., 1985). Negative results using these methodologies extended the epidemiological investigations, since the number of adults and children affected usually suggest the need to investigate other gastroenteric viruses, like HAstV and NoV, which alternate as import agents responsible for acute viral gastroenteritis (Bereciartu et al., 2002; Wilhelmi et al., 2003; Liu et al., 2006).

In the present study, laboratorial confirmation using RT-PCR for NoV infection in five children and three young relatives that attended the daycare facility located in Fazenda da Barra II, Resende, suggested the occurrence of a NoV outbreak. In the same month, another cluster of cases in the municipality of Rio Claro (81.8%) and new sporadic cases in Resende in the following months, revealed the circulation of NoV in the region. A new outbreak of acute gastroenteritis associated with NoV infection was also reported and confirmed in 80% of cases in June, in the municipality of Carmo, the mountain region of the State of Rio de Janeiro, demonstrating the circulation of NoV in the State and corroborating the occurrence of small outbreaks of acute gastroenteritis associated with NoV infection in this region (data not showed). Some reports describe that when NoV is introduced into a community or population, it may be followed by additional spread of the disease, resulting in a large number of secondary infections in up to 50% of contacts (Koopmans and Duizier, 2004)

Currently, NoVs are described as the major cause of acute gastroenteritis in adults (Fankhauser et al., 2002). However, the role of these viruses in sporadic cases or outbreaks of gastroenteritis is still underestimated, especially in developing countries, including Brazil. Routinely used for screening of a large number of samples, commercial EIA is still disappointing regarding NoV diagnosis (de Bruin et al., 2006). Although faster and less labor intensive than RT-PCR, it is not recommended, mainly due to the genetic and antigenic diversity of NoV (Jonathan et al., 2004). Usually the low sensitivity and specificity of EIA results in the need to retest negative samples using RT-PCR, increasing the cost of a correct diagnosis (Gunson et al., 2003). In addition, only a molecular epidemiology approach allows the characterization of circulating strains in a specific location and tracking the spreading of these strains into another place.

In this report, two step RT-PCR was used with PdN₆ to perform the transcription reaction, described as a gold standard method for routine diagnosis of NoV. This is not only due to the fact that two step RT-PCR using random primer is described as 100 times more sensitive than one step PCR for NoV GII detection (Pang et al., 2005), but mainly because this protocol uses the same cDNA for molecular characterization and/or other viruses detection.

Conventional PCR using a set of primers that target a relatively well conserved region at the 3'-end of ORF 1, which encodes RdRp (region B), confirmed 66% of the cases and presented a satisfactory result when compared with a TaqMan protocol, suggesting that the former is a good tool for clinical laboratory diagnosis and could be recommended for use when investigating outbreaks. However, the Taq

Man real time PCR performed in this study followed the NoV excretion titers in a naturally infected individual up to the 8th day of diarrhea. A decline in NoV titers was detected after the first week of the disease, although Rockx et al. (2002) showed diarrhea up to 22 days after the onset of disease.

In this study, NoV affected equally children and adults as reported in outbreaks caused by these viruses (Green et al., 2001; Chan et al., 2006). Interestingly, the concomitant presence of respiratory symptoms was observed, suggesting a co-infection with pathogens in children under 9 years-old, as previously described by Victoria et al. (2007) in a study carried out in hospitalized children in the municipality of Rio de Janeiro.

Although, the protocol used for NoV detection (region B) was found to work well as a trial method, since it detected both GI and GII in a single PCR, NoV genotyping characterization was performed using the protocol suggested by Vinjé et al. (2004). The GII/4 obtained in this study revealed the circulation of the same strain in the State since 1997 (Gallimore et al., 2004; Victoria et al., 2007). Here, the partial sequencing of the same region (region D) also confirmed GII/4 as the strain circulating in Carmo (Mountain Region), thus providing important information concerning the spread of viruses (data not shown). Strains belonging to GII/4 have been responsible for the majority of emerging NoV outbreaks worldwide (Bull et al., 2006; Kroneman et al., 2006).

The use of both conventional RT-PCR (region B) and region D for NoV detection and genotyping using the same cDNA, proved to be an approach that should be implemented in clinical laboratory diagnosis. This procedure, using a random primer for cDNA, has reduced the cost of routine viral gastroenteritis

diagnosis in the Reference Center and permits the detection of occurrences of co-infection, as observed here. Although co-infections among gastroenteric viruses are well documented (Oh et al., 2003; De Grazia et al., 2004; Froggatt et al., 2004; Phan et al., 2004; Dove et al., 2005; Gabbay et al., 2005), the detection of one such virus usually results in the cessation of any investigation into other infectious agents.

The current results revealed the importance of investigating the presence of viruses other than RV-A in outbreaks of acute gastroenteritis, in order to implement precautions to prevent further dissemination of the infection. A rapid and definitive diagnosis using RT-PCR encouraged us to extend the surveillance regarding NoV, since laboratory investigations into epidemiological findings proved a causal relationship between the clusters of gastroenteritis related by time and place and identified GII/4 as the causative pathogen.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Alexandre Fialho and Gilmar Alcantara for their technical assistance, and Phil Bain for English revision. The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq: 3034775/2005-6 and 303539/2004-6), IOC/FIOCRUZ, CYTED (206RT0289), and CGLAB/SVS/MS provided financial support. Dr. Roger Glass and the Viral Gastroenteritis Section staff at the Centers for Disease Control and Prevention (CDC-Atlanta), and the American Fellow Program provided training and scholarship support for MPM.

REFERENCES

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

Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, Hammer C, Garfield M, Green KY. 2003. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol* 77, 10957-74.

Bereciartu A, Bok K, Gomez J. 2002. Identification of viral agents causing gastroenteritis among children in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Virol* 25, 197-203.

Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. 2003. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* 77, 11603-15.

Bon F, Ambert-Balay K, Giraudon H, Kaplon J, Le Guyader S, Pommepuy M. 2005. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J Clin Microbiol* 43, 4659-64.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28, 495-503.

Borges AM, Teixeira JM, Costa PS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco Rde C, Brito WM, Leite JPG, Cardoso DD. 2006. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101, 721-24.

Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. 2006. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 44, 327-33.

Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinje J, Racz ML. 2006. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in Sao Paulo State, Brazil. *J Clin Microbiol* 44, 3947-53.

Chan MC, Sung JJ, Lam RK, Chan PK, Lee NL, Lai RW, Leung WK. 2006. Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 12, 1278-80.

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

De Grazia S, Giammanco GM, Colomba C, Cascio A, Arista S. 2004. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Italian children with gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 10, 1025-9.

Dove W, Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneux ME, Nakagomi O, Hart CA. 2005. Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol* 77, 522-7.

Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD. 2002. Epidemiological and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 186, 1-7.

Froggatt PC, Barry Vipond I, Ashley CR, Lambden PR, Clarke IN, Caul EO. 2004. Surveillance of norovirus infection in a study of sporadic childhood gastroenteritis in South West England and South Wales, during one winter season (1999-2000). *J Med Virol* 72, 307-11.

Gabbay YB, Glass RI, Monroe SS. 1994. Prevalence of antibodies to Norwalk virus among Amerindians in isolated Amazonian communities. *Am J Epidemiol* 139, 728-733.

Gabbay YB, Luz CR, Costa IV, Cavalcante-Pepino EL, Sousa MS, Oliveira KK, Wanzeller AL, Mascarenhas JD, Leite JPG, Linhares AC. 2005. Prevalence and

genetic diversity of astroviruses in children with and without diarrhea in São Luis, Maranhão, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100, 709-14.

Gallimore CI, Barreiros MA, Brown DW, Nascimento JP, Leite JPG. 2004. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 37, 321-6.

Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. 2001. Human Caliciviruses. In: Knipe D. M., Howley P. M., Chanock R. M., Melnick J. L., Monath T. P., Roizman B., Straus S. E. (eds.) *Fields in Virology*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 4th ed. vol 1, p. 875-893.

Gunson RN, Miller J, Carman WF. 2003. Comparison of real-time PCR and EIA for the detection of outbreaks of acute gastroenteritis caused by norovirus. *Commun Dis Public Health* 6, 297-9.

Gutierrez-Escolano AL, Vazquez-Ochoa M, Escobar-Herrera J, Hernandez-Acosta J. 2003. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 759-66.

Hall TA. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41, 95-98.

Jiang X, Graham DY, Wang K, Estes MK. 1990. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250, 1580-1583.

Jonathan AB-M, Erim MK, Rachel SB, Leslie AH, Roger IG, Ando T. 2004. Evolution and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. *J Clin Microbiol* 42, 2587-95.

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

Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N. 2006. Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Archives of Virology* 151,1291-1308.

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

Kroneman A, Vennema H, Harris J, Reuter G, von Bonsdorff CH, Hedlund KO, Vainio K, Jackson V, Pothier P, Koch J, Schreier E, Bottiger BE, Koopmans M. 2006. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveill* 11, (12) E061214.1.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163.

Lambden PR, Liu BL, Clarke IN. 1995. A conserved sequence motif at the 5' terminus of the Southampton virus genome is characteristic of the Caliciviridae. *Virus Genes* 10:149-152.

Liu C, Grillner L, Jonsson K, Linde A, Shen K, Lindell AT, Wirgart BZ, Johansen K. 2006. Identification of viral agents associated with diarrhea in young children during a winter season in Beijing, China. *J Clin Virol* 35, 69-72.

Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. 2004. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis* 39, 318-24.

Moreno-Espinosa S, Farkas T, Jiang X. 2004. Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. *Semin Pediatr Infect Dis* 15, 237-45.

Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 33, 797-801.

Oh DY, Gaedicke G, Schreier E. 2003. Viral agents of acute gastroenteritis in German children: prevalence and molecular diversity. *J Med Virol* 71, 82-93.

Pang XL, Preiksaitis JK, Lee B. 2005. Multiplex real time RT-PCR for the detection and quantitation of norovirus genogroups I and II in patients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol* 33, 168-71.

Parashar UD, Li JF, Cama R, De Zalia M, Monroe SS, Taylor DN, Figueroa D, Gilman RH, Glass RI. 2004. Human caliciviruses as a cause of severe gastroenteritis in Peruvian children. *J Infect Dis* 190, 1088-92.

Parks CG, Moe CL, Rhodes D, Lima A, Barrett L, Tseng F, Baric R, Talal A, Guerrant, R. 1999. Genomic diversity of "Norwalk like viruses" (NLVs): pediatric infections in a Brazilian shantytown. *J Med Virol* 58, 426-34.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG, Andrade ZP, De Castro L. 1985. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J Virol Methods* 10, 21-8.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JPG. 1983. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, Sao Paulo and Para, Brazil. *J Hyg* 90, 117-25.

Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima, H. 2004. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. *J Med Virol* 73, 256-61.

Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinjé J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, Koopmans M. 2002. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 35, 246-53.

Straub TM, Honer zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, Valdez CO, Bruckner-Lea CJ, Gerba CP, Abbaszadegan M, Nickerson CA. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis*. 2007 Mar;13(3):396-403.

Talal AH, Moe CL, Lima AA, Weigle KA, Barrett L, Bangdiwala SI, Estes MK, Guerrant, RL. 2000. Seroprevalence and seroincidence of Norwalk-like virus infection among Brazilian infants and children. *J Med Virol* 61, 117-24.

Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, Ando T, Glass RI, Monroe SS. 2006. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 44, 1405-12.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JPG, Miagostovich MP. 2007. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children

with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J* (in press).

Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. 2004. 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, 109-17.

Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 9, 247-62.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312-23.

Table I Distribution of noroviruses detection by polymerase chain reaction according to the municipalities, Middle Paraíba Valley Region, State of Rio de Janeiro, 2005.

Municipality	Boroughs	Positive samples/studied samples
Resende	Barra II	5/7
	Capelinha	1/1
	Cidade da Alegria	1/2
	Fazenda da Barra	3/4
	II	1/1
	Nova Alegria	3/3
	Parque	1/1
	Embaixador	0/6
	Visconde de Mauá	2/2
	Novo Surubim	1/1
	São Caetano	
Not Known		
Rio Claro	Fazenda Gama	9/11
Piraí	Arrozal	1/1
	Centro	0/2
	Varjão	5/8
Total		33/50

Table II Signs and symptoms of 50 acute gastroenteritis cases positive reported by age group (years) according to RT-PCR results.

Age groups (years)	Number of cases (number of cases confirmed by RT-PCR)					Total
	<1	1-4	5-9	10-19	>=20	
Signs and symptoms						
Diarrhea	7(9)	8(13)	5(7)	4(5)	9(16)	33(50)
Vomiting	3(5)	7(8)	2(3)	2(2)	5(8)	19(26)
Abdominal pain	2(2)	4(7)	1(1)	1(1)	6(9)	14(20)
Fever ($\geq 37.5^{\circ}$ C)	2(4)	6(10)	1(2)	0(1)	4(4)	13(21)
Anorexia	1(2)	3(6)	1(1)	0(1)	4(5)	9(15)
Mucus in feces	4(5)	1(3)	1(1)	0(0)	0(0)	6(9)
Dehydration	0(0)	1(1)	1(1)	0(0)	0(0)	2(2)
Rash	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
Respiratory Signs	4(6)	6(12)	1(1)	0(0)	0(0)	11(19)

Table III Quantitative Noroviruses detection by using real time RT-PCR from cases of acute gastroenteritis according to the days of diarrhea.

Number of days with diarrhea	Number of positive cases/Number of studied cases (%)	Number of copies of NV RNA per g of fecal sample suspension
		Minimum – Maximum (Average titer ± StDev)
1	3/4	8.2 x 10 ⁴ - 3.8 x 10 ⁸ (1.8 x 10 ⁸ ± 1.9 x 10 ⁸)
2	4/7	8.0 x 10 ⁶ - 2.5 x 10 ⁹ (7.22 x 10 ⁸ ± 1.2 x 10 ⁸)
3	8/9	4.6 x 10 ⁶ - 4.6 x 10 ⁹ (1.1 x 10 ⁹ ± 1.6 x 10 ⁹)
4	6/10	5.0 x 10 ⁶ - 1.4 x 10 ⁹ (5.5 x 10 ⁸ ± 6.2 x 10 ⁸)
5	2/4	1.2 x 10 ⁷ - 3.2 x 10 ⁷ (2.2 x 10 ⁷ ± 1.4 x 10 ⁷)
6	0/2	-
7	5/5	3.2 x 10 ⁵ - 3.2 x 10 ⁷ (1.3 x 10 ⁷ ± 1.1 x 10 ⁷)
8	1/3	5.5 x 10 ⁴
9	0/1	-
Not known	4/5	1.6 x 10 ⁵ - 1.5 x 10 ⁹ (5.0 x 10 ⁸ ± 6.7 x 10 ⁸)
Total	33/50 (66)	-

Figure 1 Age group distribution of studied cases tested by reverse-transcription polymerase chain reaction for noroviruses detection.

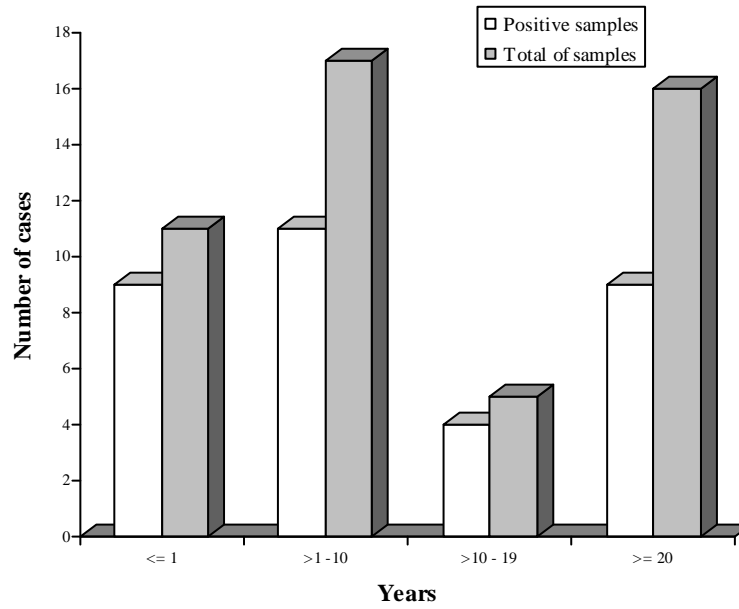
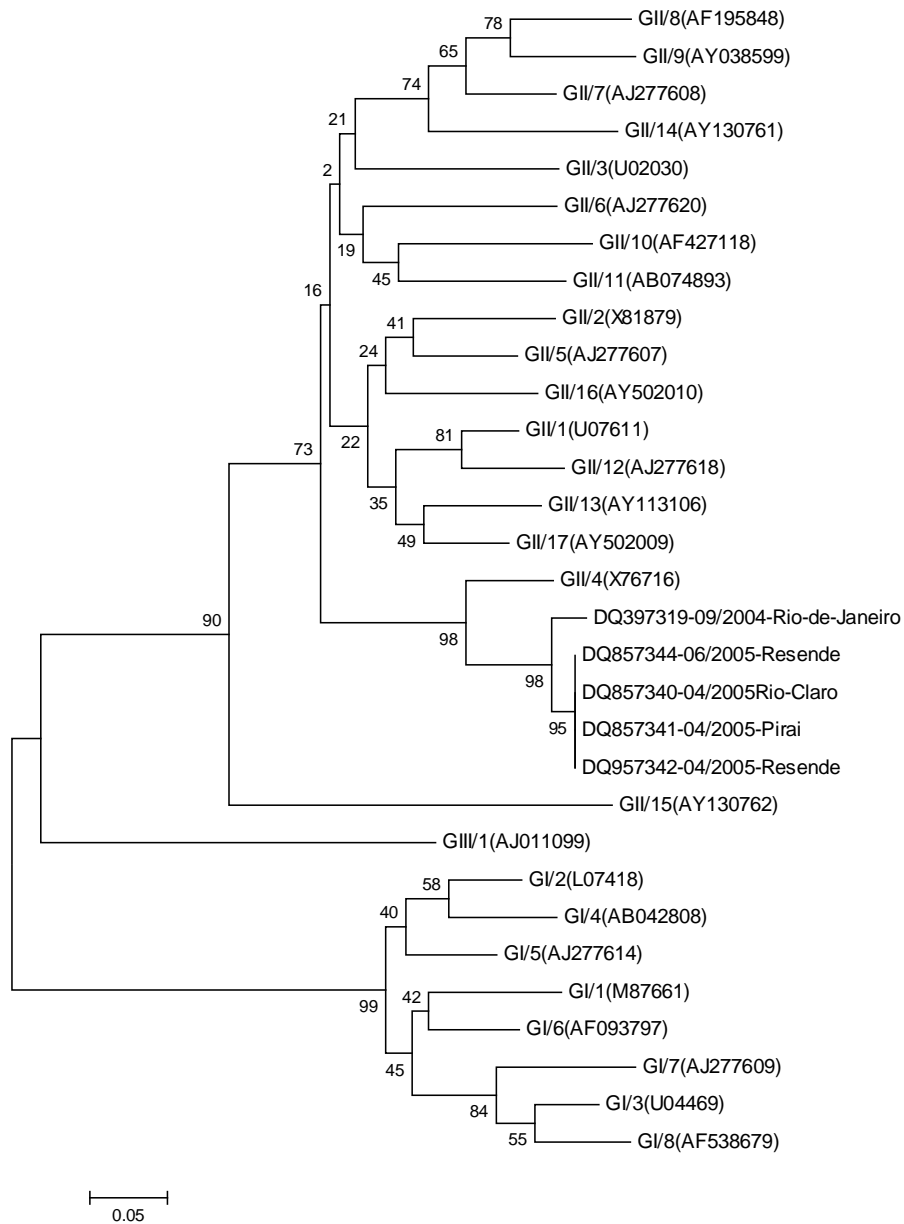


Figure 2 Phylogenetic tree based on deduced 56 aa within the capsid region (region D) of norovirus strains obtained in this study and prototypes strains. Outgroup: GI strains. Strains denomination: Genogroup/genotype followed by Genbank accession number and for Brazilian strains: Genbank accession number followed by month, year and municipality of detection.



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)