

Norovírus: uma visão geral

SIMONE GUADAGNUCCI MORILLO¹, MARIA DO CARMO SAMPAIO TAVARES TIMENETSKY²

¹ Mestrado em Ciências pelo Programa de Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde e Biologista do Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, SP

² Doutorado em Microbiologia pela Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biológicas e Diretora do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, SP

RESUMO

Os norovírus (NoV) foram os primeiros agentes virais ligados à doença gastrointestinal, entretanto, eles foram, por muito tempo, considerados como causa secundária de gastroenterite, após os rotavírus. O desenvolvimento de técnicas moleculares voltadas ao diagnóstico dos NoV forneceu dados mais claros sobre o impacto epidemiológico desses vírus, os quais são, atualmente, reconhecidos não apenas como principal causa de surtos de gastroenterite não bacteriana, mas também como causa importante de gastroenterite esporádica em crianças e adultos. Esta revisão enfoca os conhecimentos necessários para compreender a sua morfologia, genética, transmissão, patogênese e controle. Uma vez que não há vacina disponível, a prevenção da infecção por NoV depende principalmente de medidas de higiene da comunidade e pessoais.

Unitermos: Norovírus; gastroenterite; diarreia.

SUMMARY

Norovirus: an overview

Although noroviruses (NoVs) were the first viral agents linked to gastrointestinal disease, for a long time they have been considered secondary cause of gastroenteritis, second to rotaviruses as etiologic agents. The development of molecular techniques in diagnosing NoV provided a clearer insight into the epidemiological impact of these viruses, which are currently recognized not only as the leading cause of non-bacterial gastroenteritis outbreaks, but also as a major cause of sporadic gastroenteritis in both children and adults. This review focuses on the required knowledge to understand their morphology, genetics, transmission, pathogenesis, and control. Since no vaccine is available, prevention of NoV infection relies mainly on strict community and personal hygiene measures.

Keywords: Norovirus; gastroenteritis; diarrhea.

Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz, Centro de Virologia, Núcleo de Doenças Entéricas, São Paulo, SP

Artigo recebido: 18/01/2011
Aceito para publicação: 01/05/2011

Correspondência para:
Maria do Carmo Sampaio
Tavares Timenetsky
Av. Dr. Arnaldo, 355
São Paulo – SP
CEP: 01246-902
Tel: (11) 3068-2909
Fax: (11) 3085-3505
timenetsky.m@gmail.com

Conflito de interesse: Não há.

©2011 Elsevier Editora Ltda.
Todos os direitos reservados.

INTRODUÇÃO

A gastroenterite aguda é uma das doenças mais comuns em humanos; nos EUA, ocupa a segunda posição no quadro de notificação, seguida de infecção respiratória¹. Ao redor do mundo, estima-se que cerca de um bilhão de casos de diarreia aguda ocorram anualmente em crianças e adultos². A gastroenterite é comumente manifestada como diarreia branda, mas pode ocorrer de forma grave com intensificação dos sintomas (náusea e vômito), podendo levar a desidratação e morte. A mortalidade anual associada à gastroenterite tem sido estimada em quatro a seis milhões de pessoas².

A etiologia das diarreias pode envolver vários agentes, como vírus, bactérias e parasitas. Os agentes bacterianos são relativamente mais importantes em países em desenvolvimento, enquanto os agentes virais são mais relevantes em países industrializados. A importância desses agentes está relacionada com as condições de higiene e saneamento básico da população¹. Em 1972, foi descoberta uma partícula viral de 27 nm em filtrado infeccioso de amostras fecais humanas em um surto de gastroenterite na cidade de Norwalk, Ohio³. Desde então, o número de agentes virais associados a gastroenterites tem aumentado progressivamente, sendo identificados: rotavírus⁴, astrovírus⁵, *Norwalk-like vírus*⁶.

Atualmente, considera-se que a maioria das gastroenterites infantis seja causada por vírus pertencentes a quatro diferentes famílias: *Reoviridae* (rotavírus), *Caliciviridae* (norovírus e sapovírus), *Astroviridae* (astrovírus) e *Adenoviridae* (adenovírus)⁷.

ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL DOS NOROVÍRUS

Os vírions são constituídos de um capsídeo e um ácido nucleico, medindo cerca de 27 a 30 nm de diâmetro. Não possuem envoltório. O nucleocapsídeo é arredondado e exibe simetria icosaédrica. Sua estrutura de superfície revela um modelo regular com características distintas⁸. O arranjo do capsômero é claramente visível (Figura 1).

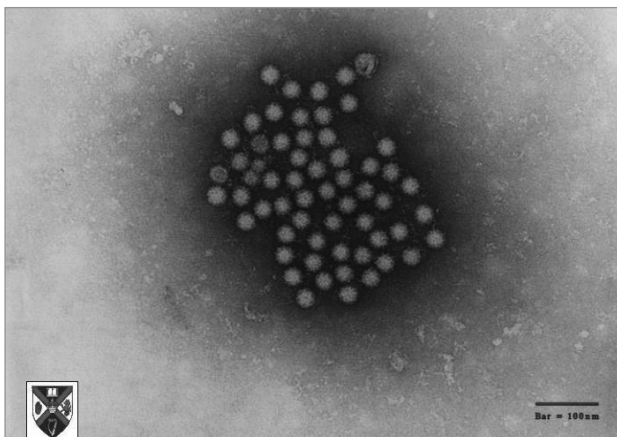


Figura 1 – Calicivirus bovino, partículas virais extraídas de amostra de fezes (Stewart McNulty, Veterinary Sciences, Queen's University, Belfast). Técnica de coloração negativa por microscopia eletrônica direta. Aumento de 33000 X. Disponível em: <http://www.qub.ac.uk>.

O genoma viral consiste em uma molécula linear de RNA fita simples de polaridade positiva. Os genomas com essas características servem como mRNA. Assim que penetram na célula-alvo, ligam-se aos ribossomos celulares, ocorrendo a tradução de proteínas. O RNA genômico serve de molde para uma fita negativa complementar, que será transcrita em RNA genômico pela polimerase viral. O genoma completo contém aproximadamente 7,5 kb; composto por 45%-56% de citosina + guanina (C + G). A extremidade 5' do genoma apresenta a proteína VPg, que tem papel essencial na infectividade viral e na tradução inicial; na extremidade 3', após a síntese do gene ocorre a adição da cauda poli A, com função de dar estabilidade à molécula e ajudar na tradução⁸.

As três seqüências de leitura abertas (ORF - *open read frame*) do genoma viral podem ser observadas na Figura 2: a primeira ORF codifica uma poliproteína de 194 K-Da que é clivada pela protease viral 3C em seis prováveis proteínas, incluindo a RNA polimerase-dependente de RNA. Assim, a extremidade 5' do genoma codifica um precursor de proteínas não estruturais, envolvidas na transcrição e replicação viral⁹. A segunda ORF codifica a proteína do capsídeo (VP1) de 60 K-Da proteína estrutural com papel importante na replicação do vírus¹⁰. A terceira ORF, considerada a região mais variável do genoma, codifica a proteína básica (VP2) de 23 K-Da e que interage com o RNA genômico quando ocorre a formação do vírion¹¹.

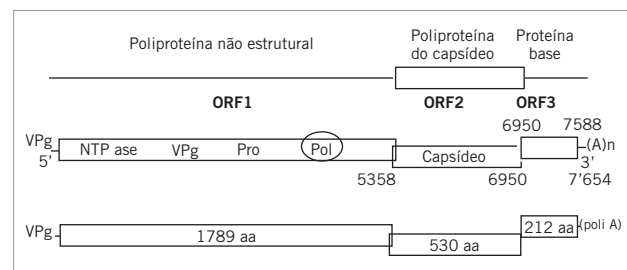


Figura 2 – Organização genômica de norovírus. Localização das três ORFs e da região Pol empregada para o desenho dos *pools de primers* utilizados na RT-PCR para a identificação dos genogrupos e genótipos. Esquema de Atmar & Estes, 2001.²⁹

NOMENCLATURA E CLASSIFICAÇÃO

Devido à baixa carga viral nas fezes e à dificuldade de propagação em cultura de células ou animais de laboratório, a classificação dos NoV só foi definida a partir de 1990. Desde então, os genomas de alguns calicivírus têm sido sequenciados, permitindo o enquadramento da maioria desses vírus na família *Caliciviridae*¹².

Em 2005, um novo sistema de classificação foi estabelecido com base nas análises filogenéticas da ORF2 de 164 seqüências de NoV. Os NoV podem ser subdivididos em cinco genogrupos (GI, GII, GIII, GIV e GV), compostos por pelo menos 31 *clusters* genéticos ou genótipos: oito genótipos no genogrupo GI; 17 no GII; 2 no GIII; um no GIV;

e um no GV¹³. Entre eles GI e GII são os genogrupos que apresentam a maior diversidade genética; seis novos genótipos foram definidos e descritos: GI/8 no genogrupo GI e GII/13-17 no genogrupo GII¹⁴. Os NoV dos genogrupos GI, GII e GIV são encontrados em humanos, com exceção da amostra de NV S11/GII encontrada em suíno; os genogrupos GIII e GV são encontrados em bovinos e camundongos, respectivamente¹⁵. Recentemente, estudos de epidemiologia molecular têm demonstrado que 70% dos surtos por NoV são causados pelo genótipo variante GII.4^{16,17}.

PATOGENIA E REPLICAÇÃO

Os calicivírus de humanos causam infecção predominantemente pela via oral. Os vírions são estáveis em ácido, possuindo habilidade para sobreviver na passagem pelo estômago. Os NoV são altamente infecciosos, devido a combinação de baixa dose infectante (DI 50 < 20 partículas virais), alto nível de excreção viral (10⁸ a 10¹⁰ cópias de RNA por grama de fezes) e excreção prolongada após recuperação clínica^{18,19}. O vírus é replicado no citoplasma dos enterócitos, onde o RNA de polaridade positiva atua como mRNA. Estudos mostraram que a eliminação do vírus pode continuar por mais de 2 semanas após a fase sintomática da doença, além de casos de infecção assintomática²⁰ com implicação nos surtos causados por doenças de transmissão alimentar²¹. Há poucas evidências de que os NoV causem infecção crônica em um hospedeiro normal, no entanto, em estudo realizado em crianças e adolescentes imunocomprometidos, Levett *et al.*²², reportaram a eliminação de NoV GII por pelo menos 8 meses.

TRANSMISSÃO

Os NoV são a maior causa de gastroenterite humana aguda não bacteriana de transmissão alimentar, ou transmissão pessoa a pessoa via fecal-oral, acometendo adultos e crianças em todo o mundo²³. Evidências indiretas de estudos epidemiológicos sugerem que os vírus podem ser transmitidos por via aérea, como nos casos de vômitos explosivos que ocorrem durante a doença²⁴. Pode ocorrer também via reservatório de água, quando águas subterrâneas são contaminadas²⁵. São altamente contagiosos, podendo ocorrer em casos esporádicos ou em grandes surtos de diarreia aguda em enfermarias, hospitais, escolas, universidades, acampamentos, cruzeiros, hotéis e restaurantes²⁶. O controle de qualidade dos alimentos é frequentemente baseado na contaminação bacteriana; assim, contaminação viral pode, muitas vezes, não ser notificada²⁷. A transmissão viral nas enfermarias é de difícil identificação²⁶. Os animais filtradores que vivem em águas contaminadas e que são consumidos crus, como as ostras, são importantes vias de transmissão²⁸.

As manifestações clínicas se caracterizam por náusea, dor abdominal, vômito, diarreia branda, autolimitada e não sanguinolenta. Porém, alguns pacientes podem apresentar formas graves, com sintomas ligados a náuseas e vômitos

seguidos de diarreia abundante, que pode acarretar em desidratação e, eventualmente, morte. O período de incubação é de 24 a 48 horas, sendo a duração dos sintomas de 12 a 60 horas²⁹. Febre baixa e dor abdominal também podem estar associadas à infecção viral, situação na qual o termo *stomach flu* é utilizado para descrever a doença, apesar de não haver qualquer associação biológica com o vírus da influenza. Aproximadamente 10% das pessoas com NoV necessitam de atendimento médico, incluindo hospitalização e tratamento contra desidratação com terapia de reidratação oral ou intravenosa. Óbitos causados por NoV são reportados com mais frequência em pessoas idosas. Cerca de 30% das infecções por NoV são assintomáticas, mas esses indivíduos são capazes de transmitir o vírus, embora com títulos mais baixos que os sintomáticos³⁰.

IMUNIDADE

Devido a falta de modelo animal e inabilidade desses vírus serem cultivados em culturas celulares, testes de neutralização *in vitro* não são viáveis e os dados do desenvolvimento da imunidade após infecção por NoV são obtidos em estudos com voluntários humanos³¹. Estudos indicam que aproximadamente 50% das pessoas expostas ao vírus adquiriram imunidade homóloga de curto prazo, que é correlacionada com níveis de anticorpos no soro³². Entretanto, pessoas com altos níveis de anticorpos para NoV preexistentes podem adoecer se expostas ao vírus^{26,32}. Uma candidata à vacina tem sido desenvolvida, embora não se saiba se induz proteção imune homotípica ou heterotípica^{31,33}. Como não existe um método adequado de prevenção e controle, o desenvolvimento de uma vacina contra o NoV pode ser a melhor solução para essa doença infecciosa³⁴. Estudos sugerem que há imunidade de curto prazo após a infecção, e alguns indivíduos são suscetíveis a infecção sintomática, enquanto outros nunca desenvolvem sintomas, mesmo após contato direto³².

PREVENÇÃO E TRATAMENTO

A interrupção da transmissão é a primeira estratégia para a prevenção, especialmente em hospitais e creches. Para cuidar de um paciente diagnosticado com gastroenterite aguda é preciso tomar algumas precauções, como lavar as mãos com água e sabão antes e depois de ter contato com o paciente ou com os objetos usados por ele. É necessário também limpar todas as superfícies com hipoclorito a 2%³⁵, pois os NoV persistem em superfícies inanimadas secas de 8 horas a 7 dias³⁶. Para evitar transmissões secundárias, é necessária a prevenção de contaminação alimentar que ocorre durante o preparo dos alimentos, lavando as mãos continuamente. Os manipuladores de alimentos devem usar luvas plásticas para o preparo de alimentos crus³⁷. Funcionários doentes não devem preparar alimentos por um período mínimo de 3 dias após a doença, para evitar os surtos de gastroenterites³⁸.

Como não há um tratamento com antiviral consolidado para combater as norovirose, o foco consiste em prevenção e tratamento da desidratação secundária da doença. A hidratação é geralmente mantida, usando-se fluido oral com líquidos isotônicos. A hospitalização em casos de desidratação grave, embora rara, pode ser necessária. Sintomas como dor de cabeça, mialgia e náusea podem ser combatidos com analgésicos e antitérmicos³⁹. Em 2006, Rossignol⁴⁰ analisou um novo medicamento indicado para o tratamento de diarreia causada por gastroenterite viral, chamado Nitazoxanide. Nesse estudo, observou a eficácia do medicamento em vários pacientes com sintomatologia e diagnóstico positivo para rotavírus, adenovírus entéricos, norovírus e astrovírus. Entretanto, o medicamento mostrou melhor efetividade contra rotavírus quando comparado com os demais patógenos virais.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O método de diagnóstico clássico é a Microscopia Eletrônica (ME), que detecta partículas virais com 27 a 30 nm de diâmetro, denominadas SRSV. Esse método é usado em laboratório de saúde pública em muitos países; no entanto, requer um microscopista altamente qualificado e um equipamento muito caro, que torna inviável estudos epidemiológicos ou clínicos⁴¹.

O método imunoenzimático (ELISA) para detecção do antígeno viral utiliza proteínas virais do capsídeo dos NoV expressas em baculovírus como reagente para ensaios imunoenzimáticos²⁹. Essa metodologia foi recentemente disponibilizada comercialmente para o diagnóstico de NoV diretamente das fezes (Dako Cytomation, Ely, UK 2001; Denka Seiken, Tokyo, Japan 2002; R-biopharm AG, Germany 2004). Esses kits apresentavam baixa sensibilidade diagnóstica, como reportado por Bull *et al.*⁴² (2006). Entretanto, o desenvolvimento de novas gerações de kits, como RIDASCREEN^{3rd} Generation kit (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany), mais sensíveis e específicos, acarretou benefícios para o diagnóstico rápido dos NoV, principalmente direcionados a surtos⁴³.

A técnica molecular de RT-PCR desenvolvida para identificação de NoV é sensível e específica, possibilitando estudos epidemiológicos para a identificação de surtos de gastroenterites⁴⁴. Estudos colaborativos internacionais⁴⁵ demonstraram que, dentre vários pools de primers desenvolvidos para as regiões ORFs 1, 2 e 3, os que apresentaram melhores resultados foram os primers da região POL da ORF 1 (região conservada). Análise filogenética de 145 nucleotídeos da região do gene POL foi usada como padrão para identificação dos genótipos. O sequenciamento dos NoV tem auxiliado nas investigações epidemiológicas relacionando casos clínicos, para determinação de fonte comum e para diferenciação de surtos que podem estar erroneamente relacionados⁴⁵.

As técnicas de *REAL-TIME TaqMan*^{46,47} RT-PCR e *SYBR Green*⁴⁸ quantificam sequências específicas de DNA ou RNA em amostras clínicas e a expressão gênica, pela detecção de fluorescência emitida desde o primeiro ciclo de amplificação. Essas metodologias apresentam vantagens sobre a PCR tradicional, como maior especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade, e permitem o monitoramento em tempo real; ciclagens mais rápidas; menor quantidade de RNA nas reações de RT-PCR; além de eliminar a manipulação do produto pós-PCR, reduzindo contaminações⁴⁵.

EPIDEMIOLOGIA

Os NoV são considerados os agentes etiológicos virais mais comuns de surtos epidêmicos de gastroenterites virais transmitidos por água e alimento⁴⁹. A epidemiologia das doenças diarreicas transmitidas por água e alimentos é rapidamente alterada com as mudanças no comportamento humano, no que diz respeito a economia global, indústria e adaptações microbiológicas. A maior incidência da doença é entre crianças com menos de 5 anos⁵⁰. No entanto, o maior impacto econômico é entre pessoas mais velhas que residem em instituições e casas de saúde⁵¹. Embora os surtos de diarreia ocorram o ano todo, alguns padrões de sazonalidades têm sido observados. Esses padrões diferem nos hemisférios norte e sul. No hemisfério norte, a gastroenterite causada por NoV é mais comum no inverno e no início da primavera²². No hemisfério sul, os surtos são mais frequentes durante a primavera e o verão⁵².

De 1999 a 2002, ocorreram 170 surtos de NoV na Espanha. Empregando-se as técnicas de ME, RT-PCR e sequenciamento, foi observado o predomínio do genótipo GII⁵³. Na Inglaterra, Lopman *et al.*⁵¹ (2003), analisando amostras de surtos ocorridos entre 1995 e 2002, observaram que os NoV tiveram o seu pico máximo de infecção durante o verão, ao contrário das divulgações da época, que descreveram maior ocorrência no inverno.

Chapin *et al.*⁵⁴ (2005) verificaram que a transmissão de NoV por contaminação de alimento atravessa fronteira; o vírus foi dos Estados Unidos para a Guatemala e o México, e as amostras foram analisadas por RT-PCR e sequenciamento, sendo identificados NoV no genótipo GI em 65% dos casos positivos.

No estado de São Paulo, durante o verão de 1995, ocorreu um surto de gastroenterites que acometeu cerca de 3.500 pessoas (dados do CVE). Análises pela ME de amostras de fezes provenientes desse surto detectaram partículas virais com morfologia de SRSV, identificadas como *Norwalk-like* pela Imunomicroscopia Eletrônica Imune (IME)⁵⁵. Essas amostras foram posteriormente analisadas por RT-PCR e sequenciamento e caracterizadas como calicivírus do tipo SMA (*Snow Mountain Agent*), atualmente denominado NoV genótipo GII⁵⁶.

Durante os anos de 2005 a 2008, um estudo de vigilância de NoV foi realizado no estado do Rio de Janeiro. Um total de 1.087 amostras fecais foi analisado e cerca de 35% foram positivas para NoV, com prevalência de 96% do genogrupo GII e 80% de GII.4; e foi descrita a necessidade de implantação do diagnóstico para NoV nos laboratórios de vigilância⁵⁷.

No estado de São Paulo, em 2005, ocorreram vários surtos de gastroenterites em crianças e adolescentes, e as análises das amostras demonstraram a circulação de diferentes vírus na mesma região. Os NoV foram detectados em 21,4% das amostras, seguidos pelos rotavírus, com 14,5%, os astrovírus, com 13,2% e os adenovírus, com 2,1%⁵⁸.

CONCLUSÃO

O Núcleo de Doenças Entéricas do Instituto Adolfo Lutz (IAL) é referência macrorregional para vigilância de rotavírus e norovírus no Programa de Monitoramento das Doenças Diarreicas Agudas (PMDDA), o qual tem por objetivo a detecção precoce de surtos de diarreia em todo o país. Em 2008, iniciou-se a implementação do diagnóstico sistemático para detecção dos NoV no IAL⁵⁹. Em 2009, com a ampliação da realização dos testes específicos, foram identificados 15 surtos por NoV detectados nos municípios de Catanduva, Mongaguá, Piracicaba, Pitangueiras, Praia Grande, Ribeirão Preto, Sabino, São Paulo, Taubaté e Votuporanga⁶⁰. Em janeiro de 2010, a cidade do Guarujá, na Baixada Santista, enfrentou um intenso surto de diarreia, identificando-se NoV (28%) e rotavírus (20%) (dados do IAL). A facilidade com que os norovírus são transmitidos e a baixa dose infectante necessária para estabelecer uma infecção resultam em extensos surtos. O diagnóstico preciso das gastroenterites virais é essencial para reduzir o impacto da doença na sociedade.

REFERÊNCIAS

- Parashar UD, Gibson CJ, Breese JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006;12:304-6.
- World Health Organization. WHO. State of the art of new vaccines: research and development. 2005. p.1-13: Diarrhoeal diseases. Available from: http://www.who.int/vaccine_research/documents/Dip%20814.pdf. [cited 2011 mar 15]
- Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972;10:1075-81.
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973;2:1281-3.
- Madeley CR, Cosgrove BP. Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 1975;2:451-2.
- Kaplan JE, Feldman R, Campbell DS, Lookabaugh C, Gary GW. Frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am J Public Health* 1982;72:1329-32.
- Yamashita T, Ito M, Tsuzuki H, Sakae K. Identification of Aichi virus infection by measurement of immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2001;39:4178-80.
- Cubitt D, Bradley DW, Carter MJ, Chiba S, Estes MK, Saif LJ *et al.* Caliciviridae. ICTVdB Index of Viruses. 2003. [cited 2004 15 oct]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>.
- Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, Hammer C, Garfield M, Green KY. In vitro proteolytic processing of the MD 145 norovirus ORF 1 non-structural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol* 2003;77:10957-74.
- Green SM, Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Human enteric *Caliciviridae*: a new prevalent SRSV group defined by RNA-dependent RNA polymerase and capsid diversity. *J Gen Virol* 1994;75:1883-8.
- Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Human caliciviruses: fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. v. 1, pp.841-74.
- Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol* 2002;147:1655-63.
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346:312-23.
- Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II Noroviruses. *J Virol Methods* 2004;116:109-17.
- Green J, Vinje J, Gallimore CI, Koopmans M, Hale A, Brown DWG. Capsid protein diversity among Norwalk-like viruses. *Virus Genes* 2000;20:227-36.
- Gallimore CI, Green J, Lewis D, Richards AF, Lopman BA, Eglin R *et al.* Diversity of noroviruses cocirculating in the north of England from 1998 a 2001. *J Clin Microbiol* 2004;42:1396-401.
- Tu ET, Nguyen T, Lee P, Bull RA, Musto J, Musto J *et al.* Norovirus GII.4 strains and outbreaks, Australia. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1128-30.
- Lee N, Chan MC, Wong B, Chor KW, Sin W, Choi KW *et al.* Fecal viral concentration and diarrhea in norovirus gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1399-401.
- Tu ET, Bull RA, Kim MJ, Mc Ivir CJ, Heron I, Mc Ivir CJ *et al.* Norovirus excretion in an aged-care setting. *J Clin Microbiol* 2008;46:2119-21.
- Okhuysen PC, Jiang X, Ye L, Johnson PC, Estes MK. Viral shedding and fecal IgA response after Norwalk virus infection. *J Infect Dis* 1995;171:566-9.
- Parashar UD, Dow L, Fankhauser RL, Miller J, Ando J, Williams KS *et al.* An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiol Infect* 1998;121:615-21.
- Levett PN, Gu M, Luan B, Fearson M, Stubber J, Jamieson F *et al.* Longitudinal study of molecular epidemiology of small round-structured viruses in a pediatric population. *J Clin Microbiol* 1996;34:1497-501.
- Kirkwood CD, Bishop RF. Molecular detection of human calicivirus in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, during 1999. *J Clin Microbiol* 2001;39:2722-4.
- Caul EO. Small round structured viruses: Airborne transmission and hospital control *Lancet*. 1994;343:1240-2.
- Leclerc H, Schwartzbrod L, Dei-Cas E. Microbial agents associated with waterborne contaminants. *Crit Rev Microbiol* 2002;28:371-409.
- 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;178:1571-8.
- Haramoto E, Katayama H, Ohgaki S. Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:2154-60.
- Nishida T, Kimura H, Saitoh M, Shhinozawa M, Kato M, Fukuda S *et al.* Detection, quantification, and phylogenetic analysis of norovirus in Japanese oysters. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:5782-6.
- Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of no cultivatable gastroenteritis viruses, the human Caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:15-37.
- Hall AJ, Vinje J, Lopman B, Park GW, Yen C, Gregoricus N *et al.* Centers of Disease Control and Prevention MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2011;60:1-16.
- Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, Du Pont HL, Buscho RF, Thornhill TS *et al.* Comparison of three agents of acute infectious non-bacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis* 1974;129:709-14.

32. Johnson PC, Mathewson JJ, Dupont HL, Greenberg HB. Multiple challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis* 1990;161:18-21.
33. Madore HP, Treanor JJ, Buja R, Dolin R. Antigenic relatedness among the Norwalk-like agents by serum antibody rises. *J Med Virol* 1990;32:96-101.
34. Estes MK, Ball JM, Crawford SE, O'Neal C, Opekun AA, Graham AA *et al.* Virus like particle vaccines for mucosal immunization. *Adv Exp Med Biol* 1997;412:387-95.
35. Wilhelmi I, Roman E, Sanchez - Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:247-62.
36. Clay S, Maherchandani S, Malik YS, Goyal SM. Survival on uncommon fomites of feline calicivirus, a surrogate of noroviruses. *Am J Infect Dis* 2006;34:41-3.
37. Thornton AC, Jennings-Conklin KS, McCormick MI. Noroviruses. Agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Manag Response* 2004;2:4-9.
38. Parashar UD, Quiraz ES, Mounts AW, Monroe SS, Fankhauser AL, Ando T *et al.* "Norwalk-like viruses": Public health consequences and outbreak management. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001;50:1-17.
39. Treanor JJ, Dolin R. Norwalk virus and other caliciviruses. In: Mandell GL, Bennett JE. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. v.2, pp.1949-56.
40. Rossignol JF, El-Gohary YM. Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24:1423-30.
41. 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.
42. Bull RA, Tu ETV, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2006;44:327-33.
43. Castriciano S, Luinstra K, Petrich A, Smieja M, Lee C, Jang D *et al.* Comparison of the RIDASCREEN[®] Norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stool also assayed by RT-PCR and electron microscopy. *J Virol Methods* 2007;141:216-9.
44. Schwab KJ, Estes MK, Neill FH, Atmar RL. Use of heat release and internal RNA standard control in reverse transcription - PCR detection of Norwalk virus from stool samples. *J Clin Microbiol* 1997;35:511-4.
45. Vinjé J, Vennema H, Maunula L, Bonsdorff CHV, Hoehne M, Schreier E. International Collaborative Study to Compare Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection and Genotyping of Noroviruses. *J Clin Microbiol* 2003;41:1423-33.
46. Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM *et al.* Use of TaqMan Real-Time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 2006;44:1405-12.
47. Utagawa ET, Hara M, Takahashi K, Watanabe M, Wakita T. Development of a rapid high-throughput method for high-resolution melting analysis for routine detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol* 2009;47:435-40.
48. Jor E, Myrmet M, Jonassen CM. SyBr green based real-time RT-PCR assay for detection and genotype prediction of bovine noroviruses and assessment of clinical significance in Norway. *J Virol Methods* 2010;169(1):1-7.
49. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 1993;195:51-61.
50. Glass RI, Bresee J, Jiang B, Gentsch J, Ando T, Fankhauser RL *et al.* Gastroenteritis viruses: an overview. *Novartis Found Symp* 2001;238:5-19, discussion 25.
51. Lopman BA, Reacher M, Gallimore C, Adak GK, Gray JJ, Brown DWG. A summertime peck of "winter vomiting disease": Surveillance of noroviruses in England and Wales, 1995 to 2002. *BMC Public Health* 2003;13:1-4.
52. Marshal IA, Hellard ME, Sinclair MI, Fairly CK, Cox BJ, Catton MG *et al.* Incidence and characteristics of endemic Norwalk - like virus - associated gastroenteritis. *J Med Virol* 2003;69:568-78.
53. García R, Hernández-Pezzi G, Ordóñez P, Varela MC. Boletín epidemiológico semanal. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2004;12:1-12.
54. Chapin AR, Carpenter CM, Dudley WC, Gibson LC, Pradesaba R, Torres O *et al.* Prevalence of Norovirus among visitors from United States to Mexico and Guatemala who experience traveler's diarrhea. *J Clin Microbiol* 2005;43:1112-7.
55. Okada S, Sekine S, Ando T, Hayashi Y, Muraio M, Yabuuchi K *et al.* Antigenic characterization of small, round-structured viruses by immune electron microscopy. *J Clin Microbiol* 1990;28:1244-8.
56. Timenetsky MCST, Kisielius JJ, Grisi SJFE, Escobar AMU, Ueda M, Tanaka H. Rotavírus, adenovírus, astrovírus, calicivírus e small round virus particles em fezes de crianças, com e sem diarreia aguda, no período de 1987 a 1988, na Grande São Paulo. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1993;53:275-80.
57. Ferreira MSR, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MPTP, Fioretti JM *et al.* Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005-2008. *J Med Virol* 2010;82:1442-8.
58. Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinjé J, RácZ ML. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo state, Brazil. *J Clin Microbiol* 2006;44:3947-53.
59. Morillo SG. Identificação e caracterização molecular de norovírus em surtos de gastroenterites no Estado de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2007.
60. CVE Centro de Vigilância Epidemiológica. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica. [citado 21 jul 2010]. Disponível em:http://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hídrica/doc/IF10_Norovirus.pdf.