



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PATRÍCIA FERNANDES NUNES DA SILVA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
NOROVÍRUS GENOTIPOS GII-11 E GII-19 EM SUÍNOS
ASSINTOMÁTICOS**

Londrina
2010

PATRÍCIA FERNANDES NUNES DA SILVA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
NOROVÍRUS GENOTIPOS GII-11 E GII-19 EM SUÍNOS
ASSINTOMÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (área de concentração em Sanidade Animal).

Orientadora: Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri
Co-orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586d Silva, Patrícia Fernandes Nunes da.
Detecção e caracterização molecular de norovírus genótipos GII-11 e GII-19 em
suínos assintomáticos / Patrícia Fernandes Nunes da Silva. – Londrina, 2010.
94 f. : il.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri.
Co-orientador: Amauri Alcindo Alfieri.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2010.
Inclui bibliografia.

1. Leitão (Suíno) – Doenças – Teses. 2. Vírus em animais – Teses. 3. Norovírus –
Teses. 4. Leitão (Suíno) – Filogenia – Teses. 5. Reação em cadeia de polimerase –
Teses. 6. Virologia veterinária – Teses. I. Alfieri, Alice Fernandes. II. Alfieri, Amauri
Alcindo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619:636.4

PATRÍCIA FERNANDES NUNES DA SILVA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE NOROVÍRUS
GENOTIPOS GII-11 E GII-19 EM SUÍNOS ASSINTOMÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciências Animais da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Animais (área de concentração em Sanidade Animal).

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Elisabete Takiuchi
Universidade Federal do Paraná / Campus Palotina

Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros
Universidade Federal do Paraná / Campus Palotina

Londrina, 20 de abril de 2010.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação da Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**
- 4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus mentores e anjos, que me dão proteção, paciência e força para realizar meus sonhos e me dão direcionamento na vida;

À Profa. Alice pelo aceite em me orientar, mesmo sabendo que eu cheguei ao Laboratório de Virologia Animal um tanto 'meio desligada' do mundo virológico, mas permitindo experimentar o novo. Ao Prof. Amauri pela co-orientação e oportunidade de doadas, paciência em conversas onde o seu otimismo acalmava (um pouco!) minha ansiedade. Muito obrigado pela experiência vivenciada, Alfieris!

À secretária de Pós-graduação Helenice, pela sua incondicional disposição em ajudar os alunos da pós. Muito obrigada pela sua paciência! Você vai pro céu, Helenice!;

Aos Profs. da UFPR campus Palotina Elisabete e Marco pelo aceite ao convite de participarem da banca de defesa;

Aos médicos veterinários Everson e Márcio pela intensa ajuda na coleta das amostras e pelos momentos de descontração entre a ida de uma propriedade a outra;

À Profa. Marlise e à Juliana Dias pela participação e contribuições na banca de qualificação. Agradeço a amizade cultivada no laboratório juntamente com a mãe de dez filhos - em tre caninos e felinos - (Marlise, claro) e pelo fraterno convívio com a Ju, desde os tempos do vôlei aos domingos;

À Aline, pela homérica paciência em me passar um pouco de sua experiência e pelas palavras de incentivo quando meus momentos de aflição eram aparentes (!). Obrigada por ter tornado nosso convívio no labs tão bom e produtivo;

À Elis, irmã de estrado, por compartilhar momentos bons, outros semi-bons, preocupações (essas foram muitas) e risadas. Obrigada também por ser um exemplo de bondade nos dias de hoje.

À Noemi, que tive o prazer de conhecer e nos tornarmos grandes irmãs, com panheira de questionamentos filosóficos ou puramente banais, parceira fiel dos chorinhos de quinta-feira e de composições musicais feitas durante a extração. MUITÍSSIMO obrigada por ter cruzado nessa vida;

Aos colegas de labs: Tonel, Michele, Cecília, Thaís pelo convívio diário que tornava o trabalho mais prazeroso e enlouquecido também (!). Obrigada à Cláudia, pela carinhosa amizade e por contribuir ao labs com sua calma e aos momentos de cantoria inserindo a MPB ao labs;

Às técnicas do labs: Dalíria, Kerlei e Maria pela atenção despendida neste período. Agradeço também aos ensinamentos valiosos;

Agradeço a todos os ca **fé(zes!!!)** feitos pela Maria e pela Neusa, que mantiveram meu corpo acordado e que foram cúmplices de muitas conversas boas durante uma PCR e outra;

Às amigas Gislaine e Rita pelos ótimos momentos e memórias que passamos juntas em Londrina desde a época de residência. Guardo com muito carinho todas as energias trocadas por nós;

À todos os Profs. da Medicina Veterinária da UEL que convivi durante esses nove anos em Londrina e que me auxiliaram na caminhada profissional;

À cidade de Londrina, pela qual tenho um enorme sentimento de gratidão, por ter conhecido pessoas especiais, com histórias de vida únicas e por ter desfrutado de uma passagem privilegiada por aqui. Principalmente, sou grata por ter construído e que ainda estou modelando, a pessoa que sou hoje.

À Brigitte (*in memoriam*), Baco, Dalí e Fumaça pelos olhares carinhosos e por tornar o nosso cotidiano mais leve e suave;

À Lory, pela fiel amizade e ideias trocadas. Sempre espero a sua campainha tocar na frente de casa!;

Agradeço ao Fernando, meu companheiro, por compartilhar a cada dia os erros e acertos, rumo ao aprendizado mútuo. Pela sua paciência única em me acalantar e pelas diversas de incentivo concreto. Obrigada pela compreensão nas horas em que me ausentei;

Aos meus pais Haley e Sonia, meus irmãos Priscila e Rogério, por serem exemplos de pessoas em quem se possam, eticamente, espelhar. Obrigada por fazerem parte dos meus caminhos, aonde quer eu esteja.

A todos com quem eu cruzei pelos corredores da UEL, que não sei os nomes ou que não me lembrei de agradecer, mas que tinham um simples sorriso.

MUITO OBRIGADA

**'Mesmo sem naus e sem rumos,
Mesmo sem vagas e areias,
Há sempre um copo de mar
para um homem navegar'**

Jorge de Lima

SILVA, Patrícia Fernandes Nunes da. **Deteção e caracterização molecular de norovírus genótipos GII-11 e GII-19 em suínos assintomáticos.** 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Os norovírus (NoV) são os maiores causadores de gastroenterites não-bacterianas em seres humanos no mundo todo, incluindo os casos associados com surtos de origem alimentar e veiculados pela água. Os membros da família *Caliciviridae* são vírus pequenos, não-envelopados e apresentam genoma de RNA fita simples positiva e poliadenilada. As noroviroses também têm sido encontradas em animais de produção como bovinos, suínos e ovinos. A detecção do RNA viral em suínos adultos assintomáticos em países da Europa, América do Norte, Australásia e América Latina tem levantado interesse na saúde pública, como a transmissão zoonótica dos NoV suínos aos seres humanos. Embora o papel do NoV suíno (PoNoV) ainda não esteja estabelecido nos países em desenvolvimento, estudos epidemiológicos têm demonstrado a ocorrência mundial dessa calicivirose nessa espécie animal. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi detectar NoV em amostras de fezes de animais assintomáticos em fase terminal (9-24 semanas de idade), em propriedades suinícolas (n=16) localizadas na cidade de Toledo, Estado do Paraná, Brasil. As amostras fecais (n=112) foram coletadas uma única vez em forma de *pool* diretamente das baias nos meses de Dezembro (2008) e Junho (2009) e estocadas a 4 °C para posterior investigação. As reações de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) foram realizadas utilizando *primers* específicos desenhados para amplificar parcialmente a região N-terminal do gene que codifica a proteína do capsídeo do PoNoV. Os produtos de PCR apresentando 181pb de tamanho esperado foram purificados e a quantificação do produto amplificado foi realizada por meio de kits comerciais. O MegaBACE™ foi utilizado para o sequenciamento, realizado com os *primers forward* e *reverse*. A análise de qualidade das sequências foram obtidas utilizando os softwares Phred e CAP3 e a procura de similaridades foi realizada com sequências depositadas no GenBank (BLAST). O alinhamento múltiplo e a matriz de identidade foram obtidas através do programa BioEdit. A árvore filogenética foi reconstruída a partir do algoritmo *Neighbor-Joining*, baseada no modelo *Poisson correction*, com 1.000 replicações de *bootstrap*, utilizando-se o software MEGA 4. Oitenta e oito por cento (14/16) dos rebanhos investigados foram considerados positivos para a presença do NV. Além disso, em 51,8% (58/112) das amostras fecais foi verificada a presença do vírus. Setenta e dois por cento (5/7) das granjas brasileiras de terminação visitadas em 2008 tinham a circulação do NoV e todas as propriedades visitadas em 2009 (n=9) foram consideradas positivas para o PoNoV. A análise filogenética de sete sequências permitiu agrupar seis estirpes brasileiras do PoNoV no genótipo II genótipo 11 (GII-11) e uma estirpe no GII-19, juntamente com outros isolados de PoNoV já caracterizados. Os resultados mostraram que o PoNoV está difundido nos rebanhos suínos incluídos neste estudo e uma alta frequência de infecção foi verificada em animais sem diarreia. Considerando o interesse da saúde pública sobre a transmissão zoonótica do PoNoV, esses resultados, obtidos em uma importante região brasileira de produção de suínos, evidenciam a importância de se realizarem futuros estudos epidemiológicos e moleculares em estirpes de NoV de origem suína.

Palavras-chave: Suínos. Fezes. Calicivírus. Norovírus. RT-PCR. Sequenciamento.

SILVA, Patrícia Fernandes Nunes da. **Detection and molecular characterization of norovirus GII-11 and GII-19 genotypes in asymptomatic pigs.** 2010. 93 p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Norovirus (NoV) is the major cause of human non-bacterial gastroenteritis worldwide including the cases associated with water and food-borne outbreaks. The members of *Caliciviridae* family are small non-enveloped viruses with a positive single stranded polyadenylated RNA genome. Noroviruses has also been found in farm animals such as cattle, pig and sheep. The detection of viral RNA from asymptomatic adult pigs in Europe, North America, Australasia and Latin America countries raises public health concerns such as zoonotic transmission of porcine NoV to humans. Although the role of porcine NoV (PoNoV) in developing countries has not been established, epidemiological studies have demonstrated the widespread occurrence of related caliciviruses in these animals worldwide. In this context, the aim of this study was to detect NoV in fecal samples of asymptomatic animals (9-24 weeks old) at fattening pig farms (n=16) located in Toledo, State of Paraná, Brazil. The stool samples (n=112) were collected once in pool form directly from pens in December, 2008 and June, 2009 and stored at 4 °C for further investigation. Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) assays were performed using specific primers designed to target a partial N-terminal region of the gene that codify the capsid protein of PoNoV. Purification and quantification of PCR products were performed with commercial kits. MegaBACE™ 1000 was used for sequencing, which was carried out with PCR forward and reverse primers. Sequence quality analysis was obtained using Phred and CAP3 software and similarity searches were performed with sequences deposited in GenBank using the BLAST. A multiple alignment and an identity matrix were produced in BioEdit. Phylogenetic tree was reconstructed using the Neighbor-Joining algorithm based on the Poisson correction model, with 1,000 replicates of bootstrap using the MEGA 4. A total of eighty-eight percent (14/16) of investigated farms were considerate positive for NoV presence. Besides, in 51.8% (58/112) of fecal samples was verified virus presence. Seventy-two percent (5/7) of Brazilian fattening herds visited in 2008 had NoV circulation and all farms visited in 2009 (n=9) were considerate positive for PoNoV. The phylogenetic analysis of seven sequences allowed to cluster six wild-type Brazilian PoNoV strains in genogroup II genotype 11 (GII-11) and one strain in GII-19, close with other already characterized PoNoV isolates. The results showed that the PoNoV is widespread in the pig herds included in this study and a high frequency of infection in animals without diarrhea was verified. Considering the public health concerns about zoonotic transmission of PoNoV these results, obtained in an important Brazilian pork-production region, highlights for the importance to carry out further epidemiologic and molecular studies in NoV strains of the porcine origin.

Keywords: Swine. Feces. Calicivirus. Norovirus. RT-PCR. Sequencing.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Norovírus em humanos e animais

- Figura 1** – Organização genômica dos norovírus, baseada na estirpe humana GI *Norwalk virus* ou NV (Hu/Norwalk/68/US, número de acesso GenBank M87661. Esquema do genoma completo do NV na direção 5' —3', onde os números representam a posição dos nucleotídeos e Poli A, a extremidade poliadenilada. VPg: proteína ligada ao genoma; A ORF1 codifica uma poliproteína que é autoclivada e dá origem a seis proteínas não estruturais: proteína 48 (p48); trifosfatase de nucleosídeos (NTPase); proteína p20 (p20); VPg; proteinase cisteína (Pro); RNase polimerase RNA dependente (Pol). A ORF2 codifica a principal proteína estrutural de capsídeo, VP1, que por sua vez é dividida em um domínio mais conservado, denominado Shell (S) e um mais variável, chamado *Protuding* (P). O domínio P ainda é subdividido em subdomínios P1 e P2. Uma região em dobradiça, flexível (Hinge) está localizada entre o domínio S e o subdomínio P1. A ORF3 codifica uma proteína estrutural básica, VP2 19
- Figura 2** – Visualização do *Norwalk virus* (NV). Micrografias eletrônicas do NV em material fecal (A) e partículas virais-like (VLPs) expressas em sistema de baculovírus (B); Vista detalhada da estrutura do capsídeo através de criomicroscopia eletrônica e cristalografia: Representação da subunidade do capsômero do NV recombinante, organizada em domínios e subdomínios (C). A porção N terminal, localizada no domínio Shell, é a região que tem contato com a face interior do capsídeo e, juntamente com o domínio Shell, mantém a estrutura icosaédrica vírica; Representação da superfície do vírus recombinante (D) 20
- Figura 3** – Reconstrução de árvore filogenética em *Neighbor-Joining*, baseada em sequências de 252 aminoácidos do gene que codifica a VP1 dos membros da família *Caliciviridae*. Utilizou-se o modelo *Poisson correction* para o cálculo das distâncias e os valores de confiança nos nodos foram obtidos pela análise de 1000 replicações de *bootstrap* 23

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

High frequency of porcine Norovirus detection in finishing units of Brazilian pig-production systems

Figure 1 – Neighbor-joining phylogenetic tree based on a 42 deduced amino acid capsid sequence of wild-type Brazilian porcine norovirus strains (UEL 19, 23, 27, 29, 65, 67 and 109 in boldface) and some published NoV strains. A porcine *Sapovirus* strain (PEC-Cowden) was used as outgroup. Accession numbers for the strains used in the analysis are: human Norwalk (M87661), human Lordsdale virus (X86557), bovine Newbury Agent 2 (AF097917), human Alpharion (AF195847), murine MNV1 (AY228235), porcine Sw918 (AB074893), porcine Sw43 (AB074892), porcine VA34 (AY077644), porcine OH-QW 101 (AY823304), porcine OH-QW170 (AY823306) and porcine PEC-Cowden (AF182760). Tree was constructed by the method of MEGA 4 using Poisson correction model. The confidence values at the nodes were obtained by performing 1000 bootstrap analysis 69

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA Norovírus em humanos e animais

Tabela 1 – Diagnóstico etiológico do norovírus em fezes de suínos por meio da transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)	32
---	----

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

High frequency of porcine Norovirus detection in finishing units of Brazilian pig-production systems

Table 1 – Detection of porcine norovirus (PoNoV) in pooled stool samples in finishing pigs of multi-site production systems of Brazilian pig herds by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), targeting the N-terminal capsid genomic region of PoNoV.....	67
Table 2 – Pairwise distance ranges of Brazilian norovirus sequences and some published porcine and human norovirus strains. A porcine sapovirus (PEC-Cowden) was used as the outgroup.....	68

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 HISTÓRICO	16
1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS	18
1.4 CLASSIFICAÇÃO	20
1.5 TRANSMISSÃO E PATOGENIA	24
1.6 IMUNIDADE.....	27
1.7 DIAGNÓSTICO	28
1.7.1 Microscopia Eletrônica.....	28
1.7.2 ELISA.....	29
1.7.3 RT-PCR.....	30
1.8 EPIDEMIOLOGIA	31
1.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS	34
2 OBJETIVOS	45
2.1 OBJETIVO GERAL.....	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	46
3.1 HIGH FREQUENCY OF PORCINE NOROVIRUS DETECTION IN FINISHING UNITS OF BRAZILIAN PIG- PRODUCTION SYSTEM.....	47
3.1.1 Abstract.....	47
3.1.2 Introduction	48
3.1.3 Materials and Methods	50
3.1.3.1 Herds.....	50
3.1.3.2 Fecal specimens and sampling	50
3.1.3.3 RNA extraction.....	50
3.1.3.4 RT-PCR	51
3.1.3.5 Sequencing and sequence analysis	52

3.1.4 Results and Discussion	53
3.1.5 Conclusion	58
3.1.6 References	59
4 CONCLUSÕES	70
ANEXOS	71
ANEXO A	72
ANEXO B	73
ANEXO C	74
ANEXO D	75
ANEXO E	76
APÊNDICES	84
APÊNDICE A – Lista de Reagentes	85
APÊNDICE B – Soluções e Tampões	87
APÊNDICE C – Protocolo de Técnicas	89

1 REVISÃO DE LITERATURA

NOROVÍRUS EM HUMANOS E ANIMAIS

1.1 INTRODUÇÃO

O norovírus (NoV) é um gênero da família *Caliciviridae*, descrito em seres humanos e animais. Os integrantes desta família podem causar diversas doenças e lesões e acometem ampla variedade de espécies hospedeiras (SCIPIONI et al., 2008).

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (*International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV*), os calicivírus estão incluídos em quatro gêneros: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus* e *Norovirus*. Outros gêneros, provisoriamente nomeados, como *Nebovirus* (bovinos), *Valovirus* (suínos) e vírus Tu-lane-Me (macaco rhesus) foram propostos para compor a família *Caliciviridae* (SMILEY et al., 2002; FARKAS et al., 2008; L'HOMME et al., 2009b).

Os vesivírus e lagovírus são importantes patógenos em medicina veterinária que acometem suínos, mamíferos marinhos, gatos, coelhos e lebres. O gênero *Vesivirus* é composto pelo vírus do exantema vesicular dos suínos (*vesicular exanthema swine virus - VESV*), considerado a estirpe protótipo dos calicivírus (CUBITT, 1996), determina lesões vesiculares epiteliais. Atualmente, a doença do exantema vesicular dos suínos está erradicada, entretanto, o vírus permanece circulante em mamíferos marinhos. Outro importante vesivírus é o calicivírus felino *feline calicivirus - FCV*. O FCV é um dos principais patógenos do trato respiratório de gatos, também determinando lesões vesiculares, ulcerações no epitélio oral e sinais sistêmicos variados (MURPHY et al., 1999).

Os lagovírus incluem duas espécies descritas em lagomorfos: o vírus da doença hemorrágica dos coelhos (*Rabbit hemorrhagic disease virus - RHDV*) e o vírus da síndrome da lebre marrom europeia (*European brown hare syndrome virus - EBHSV*). O RHDV determina uma doença altamente contagiosa, ocasionando lesões hemorrágicas nos pulmões e fígado. A morbidade e a mortalidade geralmente são altas, sendo observadas taxas de 100% e 90%, respectivamente, em coelhos infectados. As lebres quando são acometidas

pelo EBHSV desenvolvem sinais clínicos semelhantes aos ocasionados pelo RHDV (MURPHY et al., 1999).

Os membros dos gêneros *Sapovirus* e *Norovirus* são considerados os agentes patogênicos de maior importância incluídos na família *Caliciviridae*. Ambos estão associados com distúrbios entéricos em seres humanos (VINJÉ et al., 1997; FANKHAUSER et al., 1998; CHIBA et al., 2000) e animais (GUO et al., 1999; LIU et al., 1999; van der POEL et al., 2000), podendo também ser identificados em portadores assintomáticos (WANG et al., 2005a; WANG et al., 2005b; MONICA et al., 2007).

Os sapovírus (SaV) foram primeiramente descritos em 1976, em fezes de crianças por meio da visualização das partículas virais em microscopia eletrônica (*electron microscopy* -EM). Quando observados pela EM os SaV apresentam morfologia típica dos calicivírus (formato de cálice) e, devido às depressões na superfície viral, apresentam uma "Estrela-de-Davi". A estirpe protótipo do SaV humano, Sapporo/82, foi identificada após um surto de gastroenterite em um orfanato na cidade de Sapporo, no Japão. Em 1980, o SaV suíno foi identificado em amostras de fezes de arreicas de leitões. Atualmente, os SaV são considerados patógenos emergentes que causam diarreia em humanos e suínos, sendo também identificado em martas (WANG et al., 2007).

As noroviroses são a causa mais comum de surtos de gastroenterite não-bacteriana em humanos de todas as idades, particularmente crianças, em todo o mundo. Casos esporádicos da doença são comumente relatados em ambientes com restaurantes, escolas, creches, hospitais, asilos e cruzeiros marítimos. Dentre a população suscetível, os idosos estão entre os mais acometidos. Geralmente, a doença se apresenta de forma mais grave nesses indivíduos, nos imunocomprometidos e nas crianças. Em países industrializados, os NoV destacam-se como o segundo agente viral mais comum de gastroenterite em crianças menores de cinco anos de idade, ficando somente atrás do rotavírus (DONALDSON et al., 2008; *World Health Organization* - WHO, 2009).

Além de ser um dos principais patógenos entéricos de humanos, os norovírus são encontrados nas espécies bovina, ovina, suína e em camundongos (WOODE; BRIDGER, 1978; SUGIEDA et al., 1998; WOBUS et al., 2006; WOLF et al., 2009). Casos de diarreia em bezerras têm sido relacionados com infecção experimental do vírus, embora alguns surtos estejam igualmente associados com distúrbios entéricos em animais jovens (WOODE; BRIDGER, 1978; BRIDGER et al., 1984). Diferentemente, a importância do NoV no desenvolvimento de diarreia em suínos ainda não foi estabelecida (WANG et al., 2007). O NoV murino (*murine norovirus* - MNV) se caracteriza por ser um dos patógenos mais

prevalentes em camundongos de laboratório e determina infecção sistêmica e sinais de inflamação em diferentes tecidos (pulmão, fígado, pleura e peritônio) em linhagens de animais imunodeficientes (WOBUS et al., 2006; SCIPIONI et al., 2008). Ao contrário do calicivírus humano, o MNV é o único NoV que se replica em cultivo celular, indicando que o camundongo pode ser utilizado como modelo experimental para a melhor investigação do vírus. Atualmente, estudos estão sendo conduzidos com o objetivo de se avaliar os modelos de infecção para o NoV humano. Dentre eles, estão incluídos os estudos com bovinos e suínos, apesar da limitação das pesquisas devido à não propagação do vírus em cultivo celular (WOBUS et al., 2006).

Por fim, há questionamentos do impacto das noroviroses animais sobre a saúde pública. A descoberta de calicivírus geneticamente semelhantes aos NoV humanos em animais domésticos indica a possibilidade de que algumas espécies de animais domésticos possam atuar como reservatório do vírus para seres humanos, assim como a sua transmissão zoonótica (WOBUS et al., 2006).

1.2 HISTÓRICO

O estabelecimento da etiologia viral para algumas gastroenterites em seres humanos ficou prejudicado durante décadas devido à não propagação de alguns agentes virais em cultivo celular (GREEN, 2007). Em 1929, Zahrosky fez a primeira descrição da doença do vômito de inverno (*winter vomiting disease*), doença até então de etiologia desconhecida que era caracterizada por episódios de vômito autolimitante e diarreia, apresentando picos durante os meses mais frios. Somente em 1972, Kapikian e colaboradores descobriram a etiologia desta síndrome por meio de imunomicroscopia eletrônica (*immune electron microscopy - IEM*). As amostras de fezes analisadas eram de voluntários desafiados com filtrados fecais, provenientes de um grupo de estudantes afetados por gastroenterite em uma escola na cidade de Norwalk, Ohio (EUA), em 1968. As partículas virais foram precipitadas em reações antígeno-anticorpo a partir de soro de um indivíduo convalescente que adoeceu após inoculação com filtrado fecal. Com base nas características morfológicas das partículas virais visualizadas em IEM, os NoV apresentam morfologia arredondada em sua superfície, medindo 27 nm de diâmetro (ADLER; ZICKL, 1969; KAPIKIAN et al., 1972). Algumas tentativas de propagação do agente em cultivo celular ou cultura de órgãos não obtiveram

sucesso. A partir dessas descobertas iniciais, o vírus se tornou a estirpe protótipo para um grande grupo de vírus não cultiváveis, inicialmente denominados *norwalk-like virus* ou *small round structured virus* (SRSV), conhecidos atualmente como norovírus (GREEN, 2007).

Estudos anteriores sugeriram a classificação preliminar dos NoVs com os agentes *parvovirus-like*, devido às semelhanças entre os dois agentes na densidade das partículas, no tamanho relativo e na estabilidade dos vírions em ácidos e éter (DOLIN et al., 1972; KAPIKIAN et al., 1973). Entretanto, Greenberg et al. (1981) verificaram compatibilidade com os calicivírus ao estudar o tamanho e estrutura das proteínas dos vírions. Em 1987, complementou-se essa nova classificação ao identificar similaridade antigênica entre calicivírus humanos e os NoV. A avaliação de anticorpos em seres humanos por meio da técnica de radioimunoensaio (*radioimmunoassay* - RIA) reforçou o conceito que o NoV pertencia à família *Caliciviridae* (CUBITT et al., 1987). Somente em 2002, os vírus *Norwalk* (NoV) e *Norwalk-like* foram designados membros do gênero *Norovirus* (MAYO, 2002).

Desde a sua identificação nos anos 70, o progresso da caracterização molecular do NoV tem sido limitado pela impossibilidade para o seu isolamento a partir de procedimentos de rotina. Entretanto, a clonagem e o sequenciamento completo do genoma do vírus permitiram grandes avanços no estudo do vírus (JIANG et al., 1993; XI et al., 1990).

Calicivírus entéricos geneticamente semelhantes aos NoV humanos têm sido detectados em bovinos e suínos. Dentre os calicivírus entéricos bovinos (*bovine enteric calicivirus* - BEC) existem dois genótipos do NoV bovino que são representados pelas estirpes Newbury Agent-2 (Newbury2/76/UK) e Jena Agent (Jena/80/DE), ambos visualizados por EM. A estirpe Newbury Agent-2 foi identificada no Reino Unido em 1976, juntamente com Newbury Agent-1, em fezes diarréicas de bezerros gnotobióticos, experimentalmente infectados com SRSV. Porém, os vírus mostraram ser antigenicamente distintos um do outro (WOODE; BRIDGER, 1978). A estirpe Jena Agent, foi identificada em fezes diarréicas de bezerros recém nascidos na Alemanha (GUNTHER; OTTO, 1987). Outro BEC descrito é a estirpe Nebraska (NB), identificada nas fezes de um bezerro em um rebanho leiteiro dos EUA, em 1980. Filtrados fecais contendo esta estirpe, quando inoculados oralmente em bezerros gnotobióticos, ocasionaram diarreia (SMILEY et al., 2002).

A primeira detecção do NoV suíno (PoNoV) ocorreu no Japão, onde o RNA viral foi encontrado em conteúdos cecais de animais saudáveis. A caracterização das estirpes detectadas por Sugieda et al. (1998), denominadas Sw43/97/JP e Sw918/97/JP, confirmou que os isolados suínos eram geneticamente similares a outras estirpes de NoV humanos (SUGIEDA; NAKAJIMA, 2002). Considerando os estudos até então realizados, não há

associação da presença do vírus e o desenvolvimento de sinais clínicos em suínos adultos. Por esse motivo, a importância da infecção pelo PoNoV foi subestimada, desde a sua descoberta, nesta espécie animal (WANG et al., 2006).

1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os membros do gênero *Norovirus* são vírus pequenos, com diâmetro variando entre 27 e 40 nm e apresentam capsídeo não envelopado, de formato arredondado e simetria icosaédrica T=3 (ICTV, 2009). O genoma dos norovírus é constituído de RNA fita simples, linear, com polaridade positiva, poliadrenilada na extremidade 3', com 7,5 kb de tamanho. Supõe-se que o genoma viral possui uma proteína ligada covalentemente, denominada VPg (*genome-linked viral protein*) (XI et al., 1990). Apesar da existência da VPg não estar comprovada para os NoV, alguns autores citam sua importância para a transcrição, podendo também estar envolvida no início da tradução do RNA viral (DAUGHENBAUGH et al., 2003; DONALDSON et al., 2008). Os vírions possuem densidade e coeficiente de extinção de césio (CICs) de 1,36-1,41 g cm⁻³ (ICTV, 2009).

As partículas virais mantêm a infectividade em pH 2,7 por até três horas em temperatura ambiente. A viabilidade também é verificada após o tratamento com éter 20%, a 4°C durante 18 h ou ainda à incubação a 60 °C por 30 min. Os NoV são resistentes à inativação após tratamento com 3,75 a 6,25 mg/L de cloro, concentração encontrada em sistemas de distribuição de água. Entretanto, os vírions são inativados após tratamento com 10 mg/L de cloro, concentração utilizada em águas onde foi detectada algum tipo de contaminação (GREEN, 2007).

O genoma do NoV é organizado em três janelas abertas de leitura (*open reading frames* - ORFs) (Fig.1). A ORF 1 codifica uma poliproteína com aproximadamente 200 kDa que é autoclivada por uma protease de origem viral denominada proteinase cisteína (Pro). Esta clivagem dá origem a seis proteínas não-estruturais: i) NH₂-terminal (p48), que pode ter importante função no transporte de proteínas no meio intracelular; ii) 2C-like trifosfatase de nucleosídeos (NTPase); iii) proteína p20, de 20 kDa e 3A-like, que podem estar envolvidas no transporte de substâncias da membrana celular e que participam da replicação viral; iv) VPg; v) 3C-like proteinase cisteína e vi) 3D-like RNA polimerase RNA dependente (RpRd). As ORFs 2 e 3 codificam, respectivamente, duas proteínas estruturais: VP1, a

principal proteína do capsídeo; e VP2, um a proteína estrutural básica que é responsável pelo empacotamento do genoma nos vírions (ETTAYEBI; HARDY, 2003; DONALDSON et al., 2008).

A expressão de proteínas do capsídeo em células de insetos infectadas com baculovírus recombinantes resulta na montagem da proteína do NoV e em partículas semelhantes a vírus (*virus-like particles* - VLPs) vazias (JIANG et al., 1992; WHITE et al., 1997). Morfologicamente, as VLPs são similares às partículas nativas, quando visualizadas em microscopia eletrônica.

O RNA genômico da estirpe *Norwalk virus* pode ser expresso em células de mamíferos e é capaz de se replicar. Nesse sistema, ocorre a tradução de proteínas não-estruturais requeridas para a replicação viral e transcrição do RNA subgenômico (JIANG et al., 1993; ASANAKA et al., 2005). Além da estirpe *Norwalk*, sugere-se que o NoV em urino seja capaz de sintetizar RNA subgenômico (WOBUS et al., 2004). A região de junção RpRd-capsídeo nos membros da família *Caliciviridae* contém um sítio altamente conservado, de aproximadamente 20 nucleotídeos, nas moléculas de RNA genômico e subgenômico facilitando a ocorrência de recombinação entre estirpes de NoV de um mesmo genogruppo (KATAYAMA et al., 2002).

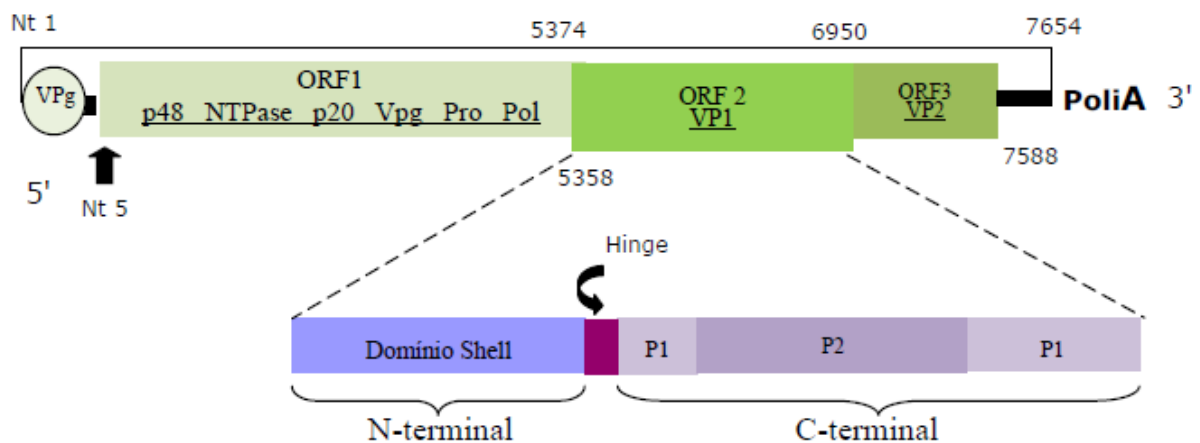


Figura 1 – Fonte: Green et al., (2007); Donaldson et al., (2008). Organização genômica dos norovírus, baseada na estirpe humana GI *Norwalk virus* ou NV (Hu/Norwalk/68/US, número de acesso GenBank M87661). Esquema do genoma completo do NV na direção 5'—3', onde os números representam a posição dos nucleotídeos e Poli A, a extremidade poliadenilada. VPg: proteína ligada ao genoma; A ORF1 codifica uma poliproteína que é autoclivada e dá origem a seis proteínas não estruturais: proteína 48 (p48); trifosfatase de nucleosídeos (NTPase); proteína p20 (p20); VPg; proteinase cisteína (Pro); RNA polimerase RNA dependente (Pol). A ORF2 codifica a principal proteína estrutural de capsídeo, VP1, que por sua vez é dividida em um domínio mais conservado, denominado Shell (S) e um mais variável, chamado *Protuding* (P). O domínio P ainda é subdividido em subdomínios P1 e P2. Uma região em dobradiça, flexível (Hinge) está localizada entre o domínio S e o subdomínio P1. A ORF3 codifica uma proteína estrutural básica, VP2.

Estudos de criomicroscopia eletrônica revelaram que a proteína VP1 forma dois domínios denominados *Shell* (S) e *Protuding* (P). O domínio S localiza-se na porção mais interna do capsídeo que compreende a região NH₂-terminal (N) e é relativamente conservada entre as sequências comparadas de NoV. O domínio P é formado pelos subdomínios P1 e P2, ambos situados na região C-terminal da proteína do capsídeo. O subdomínio P2 corresponde a porção da VP1 de maior variabilidade entre sequências de NoV humanos, além de conferir especificidade antigênica e interação do vírus com a célula hospedeira (GREEN, 2007).

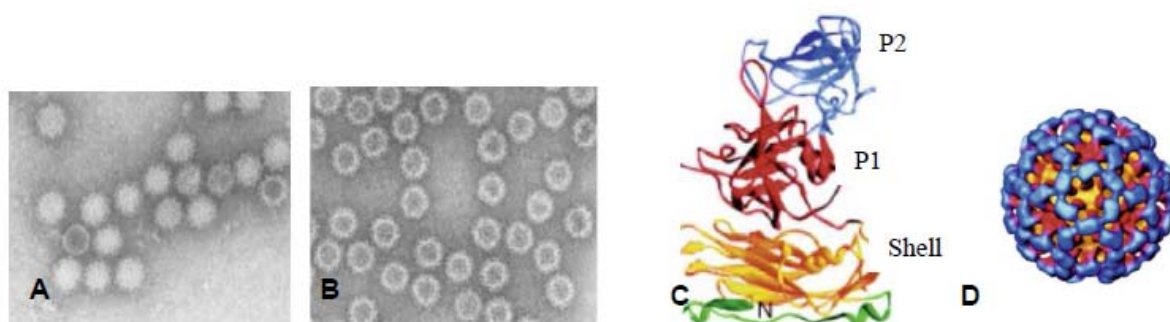


Figura 2 – Fonte: (A e B): Atmar, Estes, (2001); (C e D): Hutson et al., (2004). Visualização do *Norwalk virus* (NV). Micrografias eletrônicas do NV em material fecal (A) e partículas virais-like (VLPs) expressas em sistema de baculovírus (B); Vista detalhada da estrutura do capsídeo através de criomicroscopia eletrônica e cristalografia: Representação da subunidade do capsômero do NV recombinante, organizada em domínios e subdomínios (C). A porção N terminal, localizada no domínio Shell, é a região que tem contato com a face interior do capsídeo e, juntamente com o domínio Shell, mantém a estrutura icosaédrica vírica; Representação da superfície do vírus recombinante (D).

1.4 CLASSIFICAÇÃO

Os NoV formam um grupo geneticamente e antigenicamente diverso (PRINGLE, 1999). Para a obtenção de uma classificação padronizada dos NoV, estudos verificaram a habilidade de diferentes vírus em induzir imunidade cruzada. Por meio de IEM, partículas virais excretadas nas fezes e soros de indivíduos infectados foram utilizadas como fonte de antígenos e anticorpos, respectivamente, para a realização de testes imunológicos. Assim, os resultados obtidos pelos desafios cruzados foram utilizados por pesquisadores para a classificação de estirpes humanas de NoV, sendo observados diferentes sorotipos (KAPIKIAN, 1994). Entretanto, essa classificação possui baixa precisão devido à reatividade cruzada dos anticorpos (ANDO et al., 2000). A sorotipagem baseada na neutralização não foi

possível devido a falta de um sistema de cultivo celular para a amplificação do vírus (DUIZER et al., 2004).

Conseqüentemente, a reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) e o sequenciamento genômico se tornaram as principais ferramentas para a caracterização de diferentes estirpes de NoV. De acordo com Vinjé et al. (2004) existem quatro diferentes regiões genômicas (A-D) que são utilizadas para a detecção e genotipagem dos NoV. A região A tem como alvo o gene da polimerase; oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) desenvolvidos para regiões conservadas do genoma, como a porção 3' da ORF1 (região B) e porção 5' da ORF2 (região C) também são utilizados para a detecção; a região D compreende os subdomínios P1/P2 - a porção mais variável da VP1 - e, conseqüentemente, é a região ideal para a genotipagem do vírus. Apesar disso, estudos também demonstram que o domínio N-terminal/s/e// da proteína do capsídeo (região C) tem sido utilizado para a classificação preliminar dos NoV.

Ao analisarem 164 seqüências completas da proteína do capsídeo, Zheng et al. (2006) propuseram uma padronização para a classificação e nomenclatura de estirpes de NoV de diferentes hospedeiros em um nível abaixo de gênero. O alinhamento de seqüências de aminoácidos baseadas nas estruturas em 3D de proteínas do capsídeo foi analisado pelo método *pairwise distance analysis* e a inferência filogenética bayesiana foi utilizada com base na verossimilhança. Com este critério, a classificação dos NoV ficou definida em: (1) estirpes, (2) *clusters* ou genótipos e (3) genogrupos (GI). Com base nesse critério de classificação as 164 seqüências foram distribuídas em 29 genótipos sendo 8 genótipos no genogrupo GI, 17 no GII, 2 no GIII e 1 nos genogrupos GIV e GV.

Os genogrupos GI, GII e GIV compreendem estirpes virais encontradas em seres humanos (GREEN et al., 2000; VINJÉ; KOOPMANS, 2000; FANKHAUSER et al., 2002); o genogrupo GIII inclui os vírus identificados em bovinos (ANDO et al., 2000; OLIVER et al., 2003; van der POEL et al., 2003); e o genogrupo GV inclui as estirpes virais detectadas em camundongos (KARST et al., 2003; HSU et al., 2007;). A partir do sequenciamento parcial do genoma, os Po NoVs foram classificados no genogrupo GII (SUGIEDA; NAKAJIMA, 2002) que abriga estirpes virais de origem humana. Outros NoV de origem animal (leão e cão) foram classificados com o membro do genogrupo GIV, juntamente com estirpes humanas (MARTELLA et al., 2007, 2008b) (Figura 3).

Ao contrário dos NoV humanos, o Po NoV parece ser menos variável geneticamente. As estirpes de Po NoV foram incluídas em três *clusters* pertencentes ao GII, genogrupo que também contém as estirpes mais comumente encontradas em seres humanos:

i) GII.11, que inclui a estirpe protótipo, Po /Sw918/97/JP; ii) GII.18, genótipo mais próximo de estirpes humanas; e iii) GII.19, considerada potencial recombinante da estirpe suína GII.11 Sw43, quando analisadas pelo método RIP (*recombination identification program*). Como todas as estirpes de PoNoV, caracterizadas até o momento, foram agrupadas somente nos três genótipos descritos anteriormente, sugere-se que essas estirpes tenham se adaptado e sua ocorrência seja restrita aos suínos (WANG et al., 2005a; L'HOMME et al., 2009a).

A caracterização molecular das estirpes bovinas de NoV (Jena e Newbury Agent-2) sugeriu maior proximidade genética aos NoV humanos pertencentes ao GI, do que com estirpes humanas do GII (LIU et al., 1999; DASTIERDI et al., 1999; van der POEL et al., 2000). Pesquisas posteriores estabeleceram que os NoV bovinos formavam um genótipo distinto (GIII), geneticamente distante das estirpes humanas, desconsiderando assim seu potencial zoonótico (ANDO et al., 2000; OLIVER et al., 2003; SMILEY et al., 2003; SCIPIONI et al., 2008). Ando et al. (2000) propuseram a formação de dois *clusters* geneticamente distintos de BECs baseados na análise de pequenas regiões do capsídeo das estirpes Jena (GIII.1) e Newbury agent-2 (GIII.2).

Diferentemente, a caracterização da estirpe bovina Nebraska revelou ser um potencial protótipo de um novo gênero na família *Caliciviridae*, mais próximo dos SaV e lagovírus (SMILEY et al., 2002). Outro membro proposto para a formação deste novo gênero é o agente Newbury-1 (OLIVER et al., 2006), porém esta classificação ainda não foi aceita pelo ICTV.

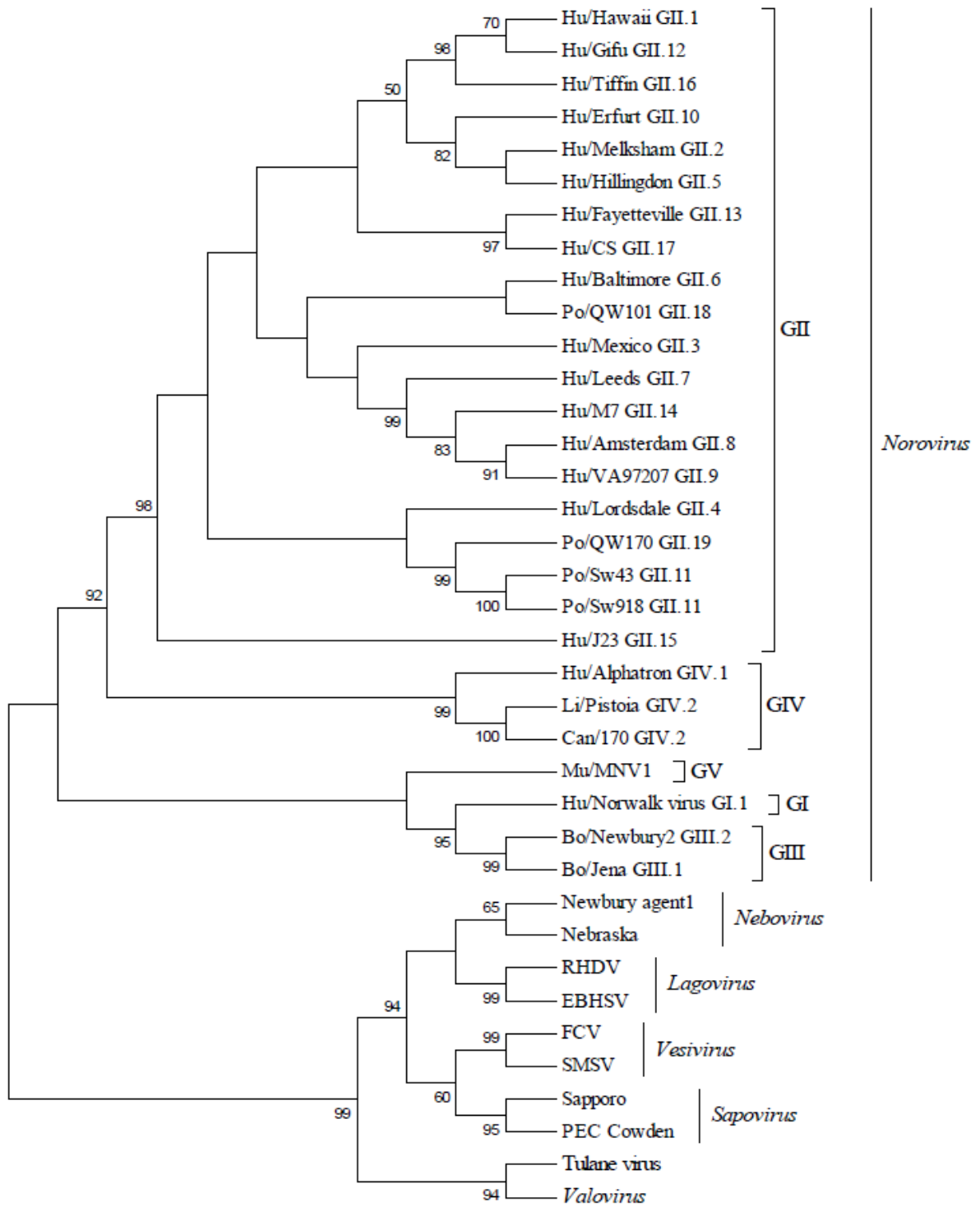


Figura 3 – Reconstrução de árvore filogenética e m *Neighbor-Joining*, baseada em sequências de 252 aminoácidos do gene que codifica a VP1 dos membros da família *Caliciviridae*. Utilizou-se o modelo *Poisson correction* para o cálculo das distâncias e os valores de confiança nos nodos foram obtidos pela análise de 1.000 replicações de *bootstrap*.

1.5 TRANSMISSÃO E PATOGENIA

A transmissão dos NoV humanos ocorre predominantemente pela via fecal-oral. A contaminação fecal em alimentos, água, fômites e o contato direto (pessoa-pessoa) são responsáveis pela ocorrência da maioria dos surtos de gastroenterite determinados por este vírus. Os alimentos podem estar contaminados com partículas virais desde a sua produção ou colheita, como no caso de ostras, ou são contaminados no local da preparação, por meio da manipulação por pessoas infectadas. Altas taxas de ataques secundários (>30%) entre pessoas que tiveram contato com indivíduos infectados levam à amplificação do surto em lugares onde há aglomeração humana. Além disso, a infecção contínua é um resultado da dificuldade de eliminação do vírus pela alta resistência a desinfetantes e pela baixa dose infectante (<10 a 100 vírions) (ATMAR; ESTES, 2006). Estudos experimentais sugerem que a transmissão de partículas virais presentes em aerossóis originados pelo vômito também pode ocorrer (GREEN, 2007).

O período de incubação (PI) após exposição ao NoV é curto, variando entre 24 e 48 h. Os sintomas da infecção incluem diarreia, vômito (sinal característico em surtos), náusea, anorexia, dor abdominal e febre. Entretanto, infecções assintomáticas ocorrem em 1/3 dos indivíduos infectados experimentalmente. A duração da doença é curta (12 a 60 h) e autolimitante, porém pacientes imunossuprimidos podem apresentar diarreia crônica e excretar o vírus durante meses ou anos (ATMAR; ESTES, 2006).

A patogenia das noroviroses em seres humanos e animais não está totalmente esclarecida. Estudos anteriores com NoV, realizados em voluntários, indicaram que as células-alvo para a replicação do vírus são, principalmente, os enterócitos da porção proximal do intestino, ocasionando diarreia por má absorção. As lesões histopatológicas determinadas pela infecção do NoV humano (GI- NoV e GII- *Hawaii*) em jejuno, incluem atrofia nas vilosidades intestinais, desarranjo das células epiteliais intestinais, hiperplasia das células da cripta, vacuolização citoplasmática e infiltrado inflamatório mononuclear na lâmina própria (DOLIN et al., 1972; AGUS et al., 1973; DOLIN et al., 1975).

Na tentativa de cultivo do NoV humano, Straub et al. (2007) demonstraram a infecção e replicação dos NoV em um modelo organoide tridimensional do epitélio intestinal humano. A partir desse modelo, novos experimentos poderão ser realizados com o objetivo de acessar os mecanismos envolvidos na patogenia e imunidade do vírus.

Recentemente, estudos relataram diferentes susceptibilidades entre indivíduos para a infecção pelo NoV hum ano, dependendo do fenótipo de antígenos dos grupos sanguíneos (*histo-blood group antigens* - HBGAs), atuando assim com o receptor para o vírus (HUTSON et al., 2004; CHEETHAM, 2006).

Os HBGAs compõem um complexo de carboidratos que se ligam à glicoproteínas ou glicolídeos que estão presentes em hemácias, células epiteliais de mucosas ou estão livres em fluidos biológicos como o sangue, saliva, conteúdo intestinal e leite. Foram descritos três padrões de ligação distintos para os NoV: sistemas ABO(H), Lewis e estatus secretor. Esses antígenos são sintetizados pela adição sequencial de monossacarídeos aos precursores dos antígenos pela ação de glicosiltransferases que são controladas por genes das famílias dos sistemas ABO(H), Lewis e estatus secretor (MARIONNEAU et al., 2001). O gene *FUT2* codifica uma glicosiltransferase que determina o fenótipo secretor (Se) de um indivíduo. Quando ativada (Se⁺), esta enzima controla a expressão dos antígenos ABO(H) presentes em células epiteliais. Portanto, um indivíduo do fenótipo O representa o precursor H sem a adição de carboidratos; então a presença do antígeno H e a ausência dos antígenos A ou B correspondem ao fenótipo O (RAVN; DABELSTEEN, 2000). Os indivíduos do fenótipo O apresentam maior susceptibilidade à infecção pelo NoV quando comparados aos indivíduos de grupo sanguíneo A e B. Um estudo com voluntários Se⁺ infectados com NoV (GI) demonstrou serem 40 vezes mais susceptíveis à infecção por NoV do que indivíduos não secretores (Se⁻) (LINDESMITH et al., 2003).

A importância do NoV como agente causador de diarreia em suínos ainda não está totalmente esclarecida. Apesar da escassez de pesquisas envolvendo a patogenia do vírus nessa espécie, verificou-se distribuição similar dos HBGAs em tecidos suínos quando comparados aos padrões de expressão descritos previamente em seres humanos. Os suínos infectados com estirpes de NoV humano (GI.1 e GII.4) apresentaram antígenos A e H tanto na mucosa oral quanto na mucosa intestinal (CHEETHAM et al., 2007). Tian et al. (2007) verificaram ligação de VLPs humanas (GI e GII) aos HBGAs de lavados celulares de epitélio gastrointestinal de origem suína. Em outro estudo, contudo, VLPs da estirpe protótipo suína Sw918 não se ligaram aos HBGAs presentes em saliva humana, indicando que outros receptores possam estar envolvidos. Sabe-se que a maioria dos HBGAs são espécie-específicos, embora epítomos em comum possam existir (FARKAS et al., 2005).

Cheetham et al. (2006) observaram diarreia branda e auto-limitante em 74% dos suínos infectados com NoV hum ano (GII.4 HS66). O PI variou entre 24 e 48 h e a diarreia foi de curta duração (1 a 3 dias). Por meio da técnica de RT-PCR verificou-se que o

período de excreção do vírus nas fezes é curto (1 a 4 dias). Esses achados são similares aos descritos em humanos infectados voluntariamente, exceto pelo fato dos sinais clínicos desenvolvidos pelos suínos não serem graves. O antígeno viral foi detectado no citoplasma de células do intestino delgado, porém as lesões histopatológicas (atrofia multifocal das vilosidades intestinais, enterócitos infectados com baixa morfologia colunar e edema da lâmina própria duodenal), ocorreram em baixa frequência (1/7) e foram consideradas de pequena intensidade. Outro achado deste experimento foi o aumento do número de enterócitos apoptóticos.

Assim como em humanos, os BECs também se replicam nos enterócitos do intestino delgado (HALL et al., 1984). Após infecção experimental das estirpes bovinas Newbury agent 1 e 2 em bezerros gnotobióticos, foram observados sinais clínicos como enterite não-hemorrágica, diarreia, má absorção de D-xilose e anorexia em ambas as infecções, sendo mais branda nos animais inoculados pelo agente 2 (BRIDGER et al., 1984). Os sinais clínicos foram mais graves no jejuno dos animais com três semanas de idade. Em outros estudos, lesões histopatológicas das infecções experimentais das estirpes Nebraska e Jena em bezerros gnotobióticos, revelaram atrofia das vilosidades de células epiteliais do duodeno e jejuno e lesões menos intensas no íleo (SMILEY et al., 2002; HAN et al., 2006).

De todos os potenciais modelos experimentais estudados para o melhor entendimento da patogenia das norovírus, o único norovírus que se replica *in vitro* é o NoV murino (MNv). Este agente se replica em macrófagos e células dendríticas derivadas de culturas de células de medula óssea e em linhagens de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) (WOBUS et al., 2004). Camundongos *knockout* para os genes RAG2 (*recombination-activating gene*) e STAT-1 (*signal transducer and activator of transcription 1*), (RAG2^{-/-}/STAT1^{-/-}), quando infectados com a estirpe MNv-1, revelaram tropismo por células hematopoiéticas (macrófagos e células dendríticas) e desenvolvimento de doença sistêmica. Os sinais clínicos incluem pneumonia, hepatite, encefalite e vasculite em capilares do cérebro e podem ser observados mesmo quando a inoculação intracerebral é passada seriamente (KARST et al., 2003; WOBUS et al., 2006; SCIPIONI et al., 2008). Foi demonstrado ainda que o NoV murino é capaz de infectar naturalmente camundongos selvagens e imunodeficientes. A infecção também ocorre após a inoculação oral ou intranasal. Entretanto, apesar de outras estirpes de MNv já terem sido isoladas das fezes (diarreicas ou não) de camundongos infectados, ainda não está definido se esse vírus é um patógeno entérico efetivo nesta espécie animal (HSU et al., 2005; WOBUS et al., 2006).

1.6 IMUNIDADE

A imunidade e a susceptibilidade do hospedeiro para as norovirose são pouco conhecidas e o padrão de resposta imune parece ser diferente do observado em outras viroses (MATSUI; GREENBERG, 2000). As primeiras pesquisas envolvendo a resposta imune dos indivíduos acometidos pelo NoV foram realizadas por meio de infecções em voluntários ou pela observação de indivíduos acometidos em surtos da doença (GREEN, 2007).

Adultos experimentalmente infectados com *Norwalk virus* apresentaram dois padrões de resposta imune após desafios seriados. Um período curto, determinado pela imunidade sorotipo-específica para o vírus e outra resposta, com imunidade mais duradoura. Voluntários que desenvolveram a doença clínica apresentaram o período curto de resposta, permanecendo resistentes à infecção durante 6 a 14 semanas após o segundo desafio com a estirpe homóloga. Entretanto, a infecção com a estirpe *Hawaii* determinou a enfermidade nesses mesmos voluntários (WYATT et al., 1974). A resposta de duração prolongada foi proposta por Parrino et al. (1977) que verificaram diferentes padrões de infecção e resistência em indivíduos desafiados com o *Norwalk virus*. O grupo de pessoas que não demonstrou sintomatologia após o primeiro desafio permaneceu resistente depois da reinfecção (31 a 34 meses após o primeiro desafio). Em contraste, os voluntários doentes voltaram a ter sintomatologia entérica após novo desafio (27 a 42 meses de intervalo). Este estudo também relatou a existência de um paradoxo ao avaliar os altos níveis de anticorpos detectados em voluntários doentes e não relacionarem com resistência à enfermidade, mesmo após a reinfecção. A mesma observação também foi verificada em estudos voluntários subsequentes (OKHUYSEN et al., 1995).

As respostas com anticorpos isotípos IgM e IgG séricos e em saliva, juntamente com a secreção de anticorpos IgA nas fezes (sIgA) de voluntários infectados com NoV humano, têm sido estudadas para acessar a imunidade à infecção. Embora a sIgA fecal seja utilizada como marcador para a infecção sintomática e haja correlação com altos títulos séricos de IgA, há estudos que não verificaram coproconversão em voluntários desafiados com o NoV (OKHUYSEN et al., 1995). Outro exemplo é a pesquisa realizada com a utilização de primatas não-humanos para infecção experimental de NoV humano, onde não foi observado soroconversão (ROCKX et al., 2005), com exceção de um animal que excretou o vírus por tempo prolongado.

Pesquisas recentes com MNoV s sugerem que a imunidade inata, especificamente as respostas imunes *interferon* (IFN)- e STAT-dependentes podem ser responsáveis pela rápida recuperação de indivíduos infectados com o NoV humano. A indução de doença em caia mundongos im unocomprometidos sugere que humanos com deficiência na resposta imune inata podem desenvolver norovirose com sintomatologia mais grave. Além disso, a variação genética dos HBGAs para as norovirose é um fator que condiciona a maior susceptibilidade à enfermidade (WOBUS et al., 2006).

Estudos que relatam a imunidade aos cal icivírus entéricos são escassos em qualquer espécie. Suínos desafiados com a estirpe humana HS66, apresentaram baixo título de anticorpos e de células secretoras de anticorpos dos isotipos IgM, IgG e IgA tanto na mucosa intestinal quanto sérico. Apenas 65% dos animais soroconverteram para IgA ou IgG ou para ambos os isotipos (SOUZA et al., 2007). Este mesmo estudo revelou que os animais inoculados apresentaram níveis elevados de IFN α no conteúdo intestinal.

1.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico laboratorial do NoV humano e animal incluem as técnicas de detecção de partículas víricas intactas (EM) e do RNA viral (RT-PCR). Ensaio imunoenzimáticos, como por exemplo, ELISA, são capazes de detectar o antígeno viral ou ainda anticorpos, sendo ambas as técnicas associadas com a produção de VLPs recombinantes (WANG et al., 2007). Atualmente, o desenvolvimento de outras técnicas para a detecção e quantificação do RNA viral por meio da PCR em tempo real já foi descrito tanto para estirpes virais de origem humana (TRUJILLO et al., 2006) quanto suína (CHEETMAN et al., 2006) e bovina (WOLF et al., 2007).

1.7.1 Microscopia Eletrônica

A EM direta é um método que permite a detecção de vírus entéricos em amostras fecais e requer uma concentração viral de pelo menos 10^6 partículas/mL de amostra, sendo considerada uma técnica de baixa sensibilidade. Aliado a isso, os NoV que não

apresentam morfologia típica dos calicivírus podem ser confundidos com outros vírus pequenos e arredondados (ex: picornavírus, enterovírus e astrovírus), devendo também ser diferenciados de material de origem não viral (ATMAR; ESTES et al., 2001; WANG et al., 2007). Variantes da técnica de EM, como a IEM (KAPIKIAN et al., 1972) e IEM de fase sólida (DASTJERDI et al., 1999) também podem ser empregadas para a identificação do NoV. O método de IEM permite a avaliação da resposta sorológica ao antígeno viral e sua utilização pode aumentar em 10 vezes a sensibilidade da EM direta. Já a especificidade pode variar dependendo de qualidade do antissoro empregado. Entretanto, essas técnicas utilizam equipamentos de alto custo e exigem recursos humanos especializados para a execução. Outro fator que limita a sua realização é o longo tempo despendido para a avaliação de uma única amostra (WANG et al., 2007). Com isso, tanto a EM quanto a IEM são utilizadas apenas com o objetivo de pesquisa e não na rotina de diagnóstico.

1.7.2 ELISA

O ELISA baseado na detecção do antígeno viral utiliza antissoro obtido pela imunização com as VLPs e camundongos, coelhos ou porquinhos-da-índia. O soro hiperimune demonstrou ser altamente específico para estirpes homólogas de NoV humano pertencentes ao mesmo genótipo (GRAHAM et al., 1994). Consequentemente, a alta especificidade desta técnica constitui uma desvantagem para os estudos epidemiológicos que necessitam de testes de triagem devido à alta variabilidade entre as estirpes de NoV humano.

A produção de VLPs do PoNoV (Sw918) permitiu o desenvolvimento de ELISA indireto para a detecção de anticorpos. Entretanto, Farakas et al. (2005) verificaram reação cruzada entre a estirpe Sw918 e os anticorpos contra as estirpes humanas de NoV do GII (genótipos 1 - *Hawaii* e 3 - *Mexico*). Contudo, a técnica de ELISA indireto se mostra mais reativa em comparação ao ELISA direto, facilitando o diagnóstico das noroviroses humanas causadas por vírus heterólogos (ATMAR; ESTES, 2001).

1.7.3 RT-PCR

A técnica molecular RT-PCR tem se tornado um dos principais métodos diagnósticos para a detecção de NoV humano, animal e em amostras ambientais. Duas estratégias têm sido comumente utilizadas para a identificação dos PoNoVs: a primeira é o emprego de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para estirpes virais de uma espécie animal. A segunda, é a utilização de *primers* que amplificam regiões conservadas de genes dos calicivírus (NoV e SaV) de estirpes humanas e de outras espécies animais. Vários fatores afetam a sensibilidade e especificidade da RT-PCR, como por exemplo, a qualidade da amostra, o método de extração e purificação do ácido nucléico utilizado, a seleção dos *primers* e o método de confirmação da especificidade dos amplicons (ATMAR; ESTES, 2001; WANG et al., 2007).

A maioria dos *primers* utilizados atualmente foram desenhados a partir da região altamente conservada da RpRd dos calicivírus, que envolve os sítios GLPSG e YGDD (ATMAR; ESTES, 2001; WANG et al., 2006). Entretanto, análises de estirpes sequenciadas a partir de regiões da RNA polimerase indicam que esse local do genoma do NoV também possui variabilidade, apresentando pelo menos 53% de identidade de nucleotídeos entre estirpes pertencentes a diferentes genogrupos e 60 a 64% de identidade entre estirpes dentro de um mesmo genogrupo (VINJÉ et al., 2000). Embora a maioria dos *primers* empregados para o diagnóstico das noroviroses amplifique regiões da polimerase, recomenda-se que a classificação genética de novas estirpes seja somente realizada com base na análise da sequência completa da VP1 (ZHENG et al., 2006).

A análise de mais de uma ORF do genoma do vírus possibilita a detecção de estirpes recombinantes. A recombinação é um evento que já foi descrito em humanos, bovinos e suínos (KATAYAMA et al., 2002; WANG et al., 2005a) e ocorre exclusivamente entre membros do mesmo genogrupo (GI a GIII). Apesar disso, a coinfecção pelos NoV de múltiplos genotipos e até mesmo de genogrupos distintos (GI e II) já foi relatada em humanos e tem-se demonstrado não ser um evento raro (GRAY et al., 1997; WANG et al., 2007).

1.8 EPIDEMIOLOGIA

Grande número de estudos, recentemente publicados, vem ressaltando a importância das norovirose como causadoras de gastroenterites agudas em seres humanos de todas as idades em todo o mundo (KOOPMANS, 2008; PATEL et al., 2008). Calcula-se que o NoV acometa em torno de 12% das crianças menores de 5 anos com gastroenterite grave e 12% dos indivíduos de todas as idades com casos de diarreia leve a moderada. Estima-se que a cada ano as norovirose sejam responsáveis por 64.000 episódios de diarreia que requerem hospitalização, 900.000 visitas de crianças a clínicas em países industrializados e até 200.000 mortes de crianças menores de 5 anos nos países em desenvolvimento (PATEL et al., 2008). No Brasil, a prevalência das norovirose em comunidades, hospitais ou creches varia entre 9 e 40% (VICTORIA et al., 2007; SOARES et al., 2007; MORILLO et al., 2008; NAKAGOMI et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008).

Assim como em seres humanos, estudos epidemiológicos têm demonstrado que os NoV animais apresentam distribuição mundial (SCIPIONI et al., 2008). Contudo, a contribuição das norovirose animais para a doença em seres humanos ainda permanece incerta (MATTISON et al., 2007).

As pesquisas de epidemiologia molecular das norovirose animais podem determinar a possibilidade de infecções cruzadas entre vírus de origem humana e animal, assim como o surgimento de estirpes virais recombinantes nos diferentes hospedeiros (KOOPMANS, 2008). Neste contexto, no Canadá, Mattison et al. (2007) identificaram estirpes GII-4, genótipo mais prevalente nas norovirose humanas, em fezes de bovinos e suínos e em carne suína crua. Em outro estudo, Farkas et al. (2005) avaliaram amostras de soros suínos para a identificação de anticorpos contra estirpes de NoV humanos GI e GII e encontraram positividade em 63% e 52%, respectivamente. Este mesmo trabalho de soroprevalência de NoV identificou alta frequência de anticorpos contra a estirpe Sw918 e em rebanhos suínos dos EUA (71%) e Japão (36%).

Vários estudos epidemiológicos utilizam a RT-PCR como método para acessar a prevalência da infecção pelo NoV em granjas suínas. A tabela 2 mostra a frequência de diagnóstico pela RT-PCR do PoNoV em diferentes países, considerando a utilização de diferentes regiões genômicas para a detecção, a faixa etária estudada, o número de amostras avaliadas, a categoria e o número dos animais positivos e a prevalência encontrada.

Após o primeiro relato do PoNoV no Japão, estudos realizados em outros países também detectaram pela RT-PCR o vírus em rebanhos suínos provenientes da Holanda, EUA, Hungria, Nova Zelândia, Bélgica, Canadá, China, Coreia do Sul, Eslovênia e Brasil (van der POEL et al., 2000; WANG et al., 2005a; MATTISON et al., 2007; REUTER et al., 2007; WOLF et al., 2007; MAUROY et al., 2008; KEUM et al., 2009; L' HOMME et al., 2009a; MIJOVSKY et al., 2009; SHEN et al., 2009; CUNHA et al., 2010).

Tabela 1 – Diagnóstico etiológico do norovírus em fezes de suínos pela técnica de RT-PCR

País	ORF	Idade	Amostras testadas	Positivos		Prevalência (%)	Referência
				n animais	categoria		
Japão	1	adulto	1117	4	terminação	0,3	Sugieda et al., 1998
Holanda	1	12-36 semanas	100 rebanhos**	2 rebanhos	terminação	2,0	van der Poel et al., 2000
EUA	1 e 2*	<12sem/24-48 sem	104(fezes) / 13(ci)	-		0,0	Farkas et al., 2005
EUA	1	10-24 sem	275	6	terminação	2,1	Wang et al., 2005a
Venezuela	1	0-9 sem	203	-		0,0	Martinez et al., 2006
EUA	1*	1 sem -> lano	621	124	terminação	20,0	Wang et al., 2006
Canadá	1	-	120	30	-	25,0	Mattison et al., 2007
Hungria	1	jovem e adulto	17	1	terminação	5,9	Reuter et al., 2007
Nova Zelândia	1 e 2	<20 sem	23	2	terminação	9,0	Wolf et al., 2007
Brasil	1	<4 sem	113	-		0,0	Barry et al., 2008
Itália	1	4-12 sem	209	-		0,0	Martella et al., 2008a
Bélgica	1 e 1*	jovem e adulto	43	2	terminação	4,6	Mauroy et al., 2008
Coreia do Sul	1*e 2*	jovem e adulto	537	10	terminação	1,9	Keum et al., 2009
Canadá	1,1*,2*,3*	<4sem/4-12sem/>12 sem	20 rebanhos e 2 abatedouros**	5 (rebanho) e 3 (abatedouro)	terminação	20,0	L'Homme et al., 2009a
China	1	<4sem/8-12sem/>12 sem	904	2	terminação	0,2	Shen et al., 2009
Eslovênia	1 e 2	<3sem/4-10sem/>11 sem	406	5	maternidade, creche e terminação	1,2	Mijovski et al., 2009
Brasil	1 e 2	>1sem/4-10sem/10-26sem	96	1	terminação	1,04	Cunha et al., 2010

*primers específicos para suínos

** pool

ci: conteúdo intestinal

1.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As noroviroses em seres humanos são reconhecidas, atualmente, como importantes agentes causadores de gastroenterites de origem alimentar e veiculadas pela água.

Diferentemente, o papel dos NoV animais em infecções em seres humanos ainda não está completamente esclarecido. Apesar da ocorrência das norovirose animais não ter sido verificada em humanos até a recente data, alguns argumentos sustentam a possibilidade de infecção intraspecie destacando-se entre eles: i) presença de anticorpos contra estirpes humanas em suínos; ii) detecção do RNA viral de estirpes tanto de origem humana quanto suína e bovina em ostras; iii) identificação de estirpes virais humanas em carne suína crua; iv) recombinação viral intragenogrupo (I, II e III) e intergenogrupos (I e II); e v) o desenvolvimento de sinais clínicos (diarreia) após infecção experimental do NoV humano em animais gnotobióticos.

A identificação das calicivirose (NoV e SaV) em rebanhos suínos no Brasil é ainda incipiente, bem como a avaliação do potencial impacto na saúde pública e animal. Sendo assim, primeiramente, é importante a realização de estudos epidemiológicos para a determinação da prevalência das norovirose animais (bovina e suína). Em seguida, a caracterização das estirpes virais circulantes e a comparação com sequências depositadas em bancos públicos de dados poderão revelar novos genótipos e, até mesmo, a provável identificação de estirpes virais de origem humana em animais.

Este estudo visa contribuir com o conhecimento das calicivirose entéricas suínas, especificamente das norovirose, em granjas de terminação da região sudoeste do estado do Paraná com o objetivo de identificar a presença ou não deste vírus em rebanhos brasileiros. Esta abordagem inicial é fundamental para que possam ser delineadas novas estratégias de investigações moleculares para a obtenção do perfil genético das estirpes virais circulantes em nosso país.

REFERÊNCIAS

ADLER, J.L.; ZICKL, R. Winter vomiting disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v.119, n.6, p.668-673, 1969.

AGUS, S.G.; DOLIN, R.; WYATT, R.G.; TOUSIMIS, A.J.; NORTHRUP, R.S. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. Histologic and enzymatic alterations during illness produced by the Norwalk agent in man. **Annals of Internal Medicine**, v.79, p.18-25, 1973.

ANDO, T.; NOEL, J.S.; FANKHAUSER, R.L. Genetic Classification of "Norwalk-like Viruses". **The Journal of Infectious Diseases**, v.181(Suppl 2), p.336-48, 2000.

ASANAKA, M.; ATMAR, R.L.; RUVOLO, V.; CRAWFORD, S.E.; NEILL, F.H.; ESTES, M.K. Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, n.29, p.10327-10332, 2005.

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

ATMAR, R.L.; ESTES, M.K. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.35, p.275-290, 2006.

BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Detection and phylogenetic analysis of porcine enteric calicivirus, genetically related to the Cowden strain of sapovirus genogroup III, in Brazilian swine herds. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.28, p.82-86, 2008.

BRIDGER, J. C.; HALL, G. A.; BROWN, J. F. Characterization of a calici-like virus (Newbury agent) found in association with astrovirus in bovine diarrhea. **Infection and Immunity**, v.43, p.133-138, 1984.

CHEETHAM, S.; SOUZA, M.; MEULIA, T.; GRIMES, S.; HAN, M.G.; SAIF, L.J. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. **Journal of Virology**, v.80, p.10372-10381, 2006.

CHEETHAM, S.; SOUZA, M.; MCGREGOR, R.; MEULIA, T.; WANG, Q.; SAIF L.S. Binding patterns of human norovirus-like particles to buccal and intestinal tissues of gnotobiotic pigs in relation to A/H histo-blood group antigen expression. **Journal of Virology**, v.81, n.7, p.3535-3544, 2007.

CHIBA, S.; NAKATA, S.; NUMATA-KINOSHITA, K.; HONMA, S. Sapporo virus: history and recent findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181 (suppl 2), p.303-308, 2000.

CUBITT, W.D.; BLACKLOW, N.R.; HERRMANN, J.E.; NOWAK, N.A.; NAKATA, S.; CHIBA, S. Antigenic relationships between human caliciviruses and Norwalk virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v.156, p.806-813, 1987.

CUBITT, W.D. Historical background and classification of caliciviruses and astroviruses. **Archives of Virology, Supplement**, v.12, p.225-235, 1996.

CUNHA, J.B.; MENDONÇA, M.C.L.; MIAGOSTOVICH, M.P.; LEITE, J.P.G. First detection of porcine norovirus GII.18 in Latin America. **Research in Veterinary Science**, article in press, doi:10.1016/j.rvsc.2009.12.013, 2010.

DASTJERDI, A.M.; GREEN, J.; GALLIMORE, C.I.; BROWN, D.W.; BRIDGER, J.C. The bovine Newbury Agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. **Virology**, v.254, p. 1-5, 1999.

DAUGHENBAUGH, K. F., FRASER, C. S., HERSHEY, J. W. & HARDY, M. E. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v.22, p.2852-2859, 2003.

DOLIN, R.; BLACKLOW, N. R.; DUPONT, H.; BUSCHO, R. F.; WYATT, R. G.; KASEL, J. A.; HORNICK, R.; CHANOCK, R. M. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.140, p.578-583, 1972.

DOLIN, R.; LEVY, A.G.; WYATT, R.G.; THORNHILL, T.S.; GARDNER, J.D. Viral gastroenteritis induced by the Hawaii agent. Jejunal histopathology and serologic response. **American Journal of Medicine**, v.59, p.761-768, 1975.

DONALDSON, E.F.; LINDESMITH, L.C.; LOBUE, A.D.; BARIC, R.S. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. **Immunological Reviews**, v.225, p.190-211, 2008.

DUIZER, E.; SCHWAB, K.J.; NEILL, F.H.; ATMAR, R.L.; KOOPMANS, M.P.G.; ESTES, M.K. Laboratory efforts to cultivate Noroviruses. **Journal of General Virology**, v.85, p.79-87, 2004.

ETTAYEBI K.; HARDY M.E. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. **Journal of Virology**, v.77, n.21, p.11790-11797, 2003.

FARKAS, T.; NAKAJIMA, S.; SUGIEDA, M.; DENG, X.; ZHONG, W.; JIANG, X. Seroprevalence of noroviruses in swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.657-661, 2005.

FARKAS, T.; SESTAK, K.; WEI, C.; JIANG, X. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. **Journal of Virology**, v.82, p.5408-5416, 2008.

FANKHAUSER, R.L.; NOEL, J.S.; MONROE, S.S.; ANDO, T.; GLASS, R.I. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v.178, p.1571-1578, 1998.

FANKHAUSER, R.L.; MONROE, S.S.; NOEL, J.S.; HUMPHREY, C.D.; BRESEE, J.S.; PARASHAR, U.D.; ANDO, T.; GLASS, R.I. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.1-7, 2002.

GRAHAM, D.Y.; JIANG, X.; TANAKA, T.; OPEKUN, A.R.; MADORE, H.P.; ESTES, M.K. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. **The Journal of Infectious Diseases**, v.170, n.1, p.34-43, 1994.

GRAY, J.J.; GREEN, J.; CUNLIFFE, C.; GALLIMORE, C.; LEE, J.V.; NEAL, K. Mixed genogroup SRSV infections among a party of canoeists exposed to contaminated recreational water. **Journal of Medical Virology**, v.52, n.4, p.425-429, 1997.

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

GREEN, K.Y.; ANDO, T.; BALAYAN, M.S.; BERKE, T.; CLARKE, I.N.; ESTES, M.K.; MATSON, D.O.; NAKATA, S.; NEILL, J.D.; STUDDERT, M.J.; THIEL, H.J. Taxonomy of the caliciviruses. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, Suppl.2, p.S322-S330, 2000.

GREENBERG, H.B.; VALDESUSO, J.R.; KALICA, A.R.; WYATT, R.G.; MCAULIFFE, V.J.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Proteins of norwalk virus. **Journal of Virology**, p.994-999, 1981.

GUO, M.; CHANG, K.O.; HARDY, M.E.; ZHANG, Q.; PARWANI, A.V.; SAIF, L.J. Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to Sapporo-like human caliciviruses. **Journal of Virology**, v.73, p.9625-9631, 1999.

GÜNTHER, H.; OTTO, P. Studies into diarrhoea of young calves. Seventh communication: "Zackenvirus" (Jena-Agens 117/80) a new diarrhoea pathogen to calf. **Archiv für Experimentelle Veterinarmedizin, Leipzig**, v.41, p.934-938, 1987.

HALL, G. A.; BRIDGER, J.C.; BROOKER, B.E.; PARSONS, K.R.; ORMEROD, E. Lesions of gnotobiotic calves experimentally infected with a calicivirus like (Newbury) agent. **Veterinary Pathology**, v.21, p.208-215, 1984.

HAN, M.G.; CHEETHAM, S.; AZEVEDO, M.; THOMAS, C.; SAIF, L.J. Immune responses to bovine norovirus-like particles with various adjuvants and analysis of protection in gnotobiotic calves. **Vaccine**, v.24, n.3, p.317-326, 2006.

HSU, C.C.; WOBUS, C.E.; STEFFEN, E.K.; RILEY, L.K.; LIVINGSTON, R.S. Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, p. 1145-1151, 2005.

HSU, C.C.; RILEY, L.K.; LIVINGSTON, R.S. Molecular characterization of three novel murine noroviruses. **Virus Genes**, v.34, p. 147-155, 2007.

HUTSON, A. M.; ATMAR, R.L.; ESTES, M.K. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. **Trends in Microbiology**, v.12, p.279-287, 2004.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV. **The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>>. Acesso em 10 jul.2009.

JIANG, X.; WANG, M.; GRAHAM, D.Y.; ESTES, M.K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. **Journal of Virology**, v.66, n.11, p.6527-6532, 1992.

JIANG, X.; WANG, M.; WANG, K.; ESTES, M.K. Sequence and genome organization of Norwalk virus. **Virology**, v.195, p.51-63, 1993.

KAPIKIAN, A.Z.; WYATT, R.G.; DOLIN, R.; THORNHILL, T.S.; KALICA, A.R.; CHANOCK, R.M. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **Journal of Virology**, v.10, n.5, p.1075-1081, 1972.

KAPIKIAN, A. Z.; GERIN, J. L.; WYATT, R. G.; THORNHILL, T. S.; CHANOCK, R. M. Density in cesium chloride of the 27-nm "8FIIa" particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis: determination by ultracentrifugation and immune electron microscopy. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 142, p.874-877, 1973.

KAPIKIAN, A.Z. Norwalk and Norwalk-like viruses. In: _____. **Viral infections of the gastrointestinal tract**. ed., New York:Marcel Dekker, 1994, p.471-518.

KARST, S.M.; WOBUS, C.E.; LAY, M.; DAVIDSON, J.; VIRGIN, H.W. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. **Science**, v.299, p. 1575-1578, 2003.

KATAYAMA, K.; SHIRATO-HORIKOSHI, H.; KOJIMA, S.; KAGEYAMA, T.; OKA, T.; HOSHINO, F. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. **Virology**, v.299, n.2, p.225-239, 2002.

KEUM, H.; MOON, H.; PARK, S.; KIM, H.; RHO, S.; PARK, B. Porcine noroviruses and sapoviruses on Korean swine farms. **Archives of Virology**, v.154, p.1765-1774, 2009.

KOOPMANS, M.P. Progress in understanding norovirus epidemiology. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.21, p.544-552, 2008.

L'HOMME, Y.; SANSREGRET, R.; PLANTE-FORTIER, E.; LAMONTAGNE, A.M.; LACROIX, G.; OUARDANI, M.; DESCHAMPS, J.; SIMARD, G.; SIMARD, C. Genetic diversity of porcine Norovirus and Sapovirus: Canada, 2005-2007. **Archives of Virology**, v.154, p.581-593, 2009a.

L'HOMME, Y.; SANSREGRET, R.; PLANTE-FORTIER, E.; LAMONTAGNE, A.; OUARDANI, M.; LACROIX G.; SIMARD, C. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. **Virus Genes**, v.39, n.1, p.66-75, 2009b.

LINDESMITH, L.; MOE, C.; MARIONNEAU, S; RUVOEN, N.; JIANG, X.; LINDBLAD, L.; STEWART, P.; LEPENDU, J.; BARIC, R. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. **Nature Medicine**, v.9, p.548-553, 2003.

LIU, B. L.; LAMBDEN, P. R.; GUNTHER, H.; OTTO, P.; ELSCHNER, M.; CLARKE, I. N. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. **Journal of Virology**, v.73, p.819-825, 1999.

MARIONNEAU, S.; CAILLEAU-THOMAS, A.; ROCHER, J.; LE MOULLAC-VAIDYE, B.; RUVOEN, N.; CLEMENT, M.; LE PENDU, J. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. **Biochimie**, v.83, p.565-573, 2001.

MARTELLA, V.; CAMPOLO, M.; LORUSSO, E.; CAVICCHIO, P.; CAMERO, M.; BELLACICCO, A.L.; DECARO, N.; ELIA, G.; GRECO, G.; CORRENTE, M.; DESARIO, C.; ARISTA, S.; BANYAI, K.; KOOPMANS, M.; BUONAVOGLIA, C. Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.7, p.1071-1073, 2007.

MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; BANYAI, K.; DECARO, N.; CORRENTE, M.; ELIA, G.; CAVALLI, A.; RADOGNA, A.; COSTANTINI, V.; SAIF, L.J.; LAVAZZA, A.; DI TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C. Identification of a porcine calicivirus related genetically to human sapoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.6 p.1907-1913, 2008a.

MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; DECARO, N.; ELIA, G.; RADOGNA, A.; D'ABRAMO, M.; DESARIO, C.; CAVALLI, A.; CORRENTE, M.; CAMERO, M.; GERMINARIO, C.A.; BANYAI, K.; DI MARTINO, B.; MARSILIO, F.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.8, p.1306-1038, 2008b.

MARTÍNEZ, M.A.; ALCALÁ, A.C.; CARRUYO, G.; BOTERO, L.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J.E. Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. **Veterinary Microbiology**, v.116, p.77-84, 2006.

MATSUI, S.M.; GREENBERG, H.B. Immunity to calicivirus infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, Suppl 2, p. 331-335, 2000.

MATTISON, K.; SHUKLA, A.; COOK, A.; POLLARI, F.; FRIENDSHIP, R.; KELTON, D.; BIDAWID, S.; FARBER, J.M. Human noroviruses in swine and cattle. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.8, p.1185-1188, 2007.

MAUROY, A.; SCIPIONI, A.; MATHIJS, E.; MIRY, C.; ZIANT, D.; THYS, C.; THIRY, E. Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium. **Archives of Virology**, v.153, p.1927-1931, 2008.

MAYO, M.A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Archives of Virology**, v.147, n.8, p.1655-6, 2002.

MIJOVSKI, J.Z.; POLJSAK-PRIJATELJ, M.; STEYER, A.; BARLIC-MAGANJA, D.; KOREN, S. Detection and molecular characterisation of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. **Infection, Genetics and Evolution**, article in press, doi:10.1016/j.meegid.2009.11.010, 2009.

MONICA, B.; RAMANI, S.; BANERJEE, I.; PRIMROSE, B.; ITURRIZA-GOMARA, M.; GALLIMORE, C.I.; BROWN, D.W.; MOSES, P.D.; GRAY, J.J.; KANG, G. Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India. **Journal of Medical Virology**, v.79, p.544-551 2007.

MORILLO, S.G.; CILLI, A.; CARMONA, R.C.C.; TIMENETSKY, M.C.S.T. Identification and molecular characterization of norovirus in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n4, p.619-622, 2008.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. *Caliciviridae*. In: _____. **Veterinary Virology**. 3ed. San Diego: Academic Press, 1999. p.533-541.

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

OKHUYSEN, P.C.; JIANG, X.; YE, L.; JOHNSON, P.C.; ESTES, M.K. Viral shedding and fecal IgA response after Norwalk virus infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v.171, n.3, p.566-569, 1995.

OLIVER, S.L.; BATTEN, C.A.; DENG, Y.; ELSCHNER, M.; OTTO, P.; CHARPILLENNE, A.; CLARKE, N.; BRIDGER, J.C.; LAMB DEN P.R. Genotype 1 and genotype 2 bovine noroviruses are antigenically distinct but share a cross-reactive epitope with human noroviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.3, p.992-998, 2006.

OLIVER, S.L.; DASTJERDI, A.M.; WONG, S.; EL-ATTAR, L.; GALLIMORE, C.; BROWN, D.W.; GREEN, J.; BRIDGER, J.C. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. **Journal of Virology**, v.77, p.2789-2798, 2003.

PARRINO, T.A.; SCHREIBER, D.S.; TRIER, J.S.; KAPIKIAN, A.Z.; BLACKLOW, N.R. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. **The New England Journal of Medicine**, v.297, n.2, p.86-89, 1977.

PATEL, M.M.; WIDDOWSON, M.A.; GLASS, R.I.; AKAZAWA, K.; VINJÉ, J.; PARASHAR U.D. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.8, p.1224-31, 2008.

PRINGLE, C.R. Virus taxonomy. **Archives of Virology**, v.144, p.421-429, 1999.

RAVN, V.; DABELSTEEN, E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica**, v.108, p.1-28, 2000.

REUTER, G.; BIRO, H.; SZUCS, G. Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary. **Archives of Virology**, v.152, p.611-614, 2007.

RIBEIRO, L.R.; GIUBERTI, R.S.; BARREIRA, D.M. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.201-206, 2008.

ROCKX, B.H.; M. OGERS, B.W.; HEENEY, J.L.; van AMERONGEN, G.; KOOPMANS, M.P. Experimental norovirus infections in non-human primates. **Journal of Medical Virology**, v.75, p.313-320, 2005.

SCIPIONI, A.; MAUROY, A.; VINJÉ, J.; THIRY, E. Animal Noroviruses. **The Veterinary Journal**, v.178, p.32-45, 2008.

SHEN, Q.; ZHANG, W.; YANG, S.; CHEN, Y.; NING, H.; SHAN, T.; LIU, J.; YANG, Z.; CUI, L.; ZHU, J.; HUA, X. Molecular detection and prevalence of porcine caliciviruses in eastern China from 2008 to 2009. **Archives of Virology**, v.154, p.1625-1630, 2009.

SMILEY, J.R.; CHANG, K.O.; HAYES, J.; VINJÉ, J.; SAIF, L.J. Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new genus. **Journal of Virology**, v.76, p.10089-10098, 2002.

SMILEY, J.R.; HOET, A.E.; TRAVEN, M.; TSUNEMITSU, H.; SAIF, L.J. Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.3089-3099, 2003.

SOARES, C.C.; SANTOS, N.; BEARD, R.S. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.1244-1246, 2007.

SOUZA, M.; CHEETHAM, S.M.; AZEVEDO, M.S.P.; COSTANTINI, V.; SAIF, L.J. Cytokine and antibody responses in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus genogroup II.4 (HS66 strain). **Journal of Virology**, v.81, n.17, p.9183-9192, 2007.

STRAUB, T.M.; BENTRUP, K.H.Z.; COGHLAN, P.O.; DOHNALKOVA, A.; MAYER, B.K.; BARTHOLOMEW, R.A.; VALDEZ, C.O.; BRUCKNER-LEA, C.J.; GERBA, C.P.; ABBASZADEGAN, M.A.; NICKERSON, C.A. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.3, p. 396-403, 2007.

SUGIEDA, M.; NAGAOKA, H.; KAKISHIMA, Y.; OHSHITA, T.; NAKAMURA, S.; NAKAJIMA, S. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. **Archives of Virology**, v.143, n.215-221, 1998.

SUGIEDA, M.; NAKAJIMA, S. Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus 'Norwalk-like viruses'. **Virus Research**, v.87, p.165-172, 2002.

TIAN, P.; JIANG, X.; ZHONG, W.; JENSEN, H.M.; BRANDL, M.; BATES, A.H.; ENGELBREKTSON, A.L.; MANDRELL, R. Binding of recombinant norovirus like particle to histo-blood group antigen on cells in the lumen of pig duodenum. **Research in Veterinary Science**, v.83, p. 410-418, 2007.

TRUJILLO, A.A.; MCCAUSTLAND, K.A.; ZHENG, D.P.; HADLEY, L.A.; VAUGHN, G.; ADAMS, S.M.; ANDO, T.; GLASS, R.I.; MONROE, S.S. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.1405-1412, 2006.

van der POEL, W.H.; VINJÉ, J.; van DER HEIDE, R.; HERRERA, M.I.; VIVO, A.; KOOPMANS, M.P. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. **Emerging Infectious Diseases**, v.6, n.1, p.36-41, 2000.

van der POEL, W.H.; van der HEIDE, H.; VERSCHOOR, F.; GELDERBLOM, H.; VINJÉ, J.; KOOPMANS, M.P. Epidemiology of Norwalk-like virus infection in cattle in The Netherlands. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.297-309, 2003.

VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F.A.; HEINEMANN, M.B. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.26, p.602-606, 2007.

VINJÉ, J.; ALTENA, S.A.; KOOPMANS M.P. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. **The Journal of Infectious Diseases**, v.176, p.1374-1378, 1997.

VINJÉ J.; GREEN, J.; LEWIS, D.C.; GALLIMORE, C.I.; BROWN, D.W.; KOOPMANS, M.P. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". **Archives of Virology**, v.145, n.2, p.223-241, 2000.

VINJÉ, J.; KOOPMANS, M.P. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.2595-2601, 2000.

VINJÉ, J.; HAMIDJAJA, R.A.; SOBSEY, M.D. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. **Journal of Virological Methods**, v.116, p.109-117, 2004.

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

WANG, Q.H.; HAN, M.G.; CHEETHAM, S.; SOUZA, M.; FUNK, J.A.; SAIF, L.J. Porcine noroviruses related to human noroviruses. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.12, p.1874-1881, 2005a.

WANG, Q.H.; HAN, M.G.; FUNK, J.A.; BOWMAN, G.; JANIES, D.A.; SAIF, L.J. Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.5963-5972, 2005b.

WANG, Q.H.; SOUZA, M.; FUNK, J.A.; ZHANG, W.; SAIF, L.J. Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. **Journal of Clinical microbiology**, v.44, n.66, p.2057-2062, 2006.

WANG, Q.H.; COSTANTINI, V.; SAIF, L.J. Porcine enteric caliciviruses: Genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. **Vaccine**, v.25, p.5453-5466, 2007.

WHITE, L.J.; HARDY, M.E.; ESTES, M.K. Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells. **Journal of Virology**, v.71, n.10, p.8066-8072, 1997.

WOBUS, C.E.; KARST, S.M.; THACKRAY, L.B.; CHANG, K.O.; SOSNOVTSEV, S.V.; BELLIOT, G.; KRUG, A.; MACKENZIE, J.M.; GREEN, K.Y.; VIRGIN, H.W. Replication of a Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. **Public Library of Science Biology**, v.2, n.12, p.e432, 2004.

WOBUS, C.E.; THACKRAY, L.B.; VIRGIN IV, H.W. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. **Journal of Virology**, v.80, n.11, p. 5104-5112, 2006.

WOLF, S.; WILLIAMSON, W.H.; HEWITT, J.; RIVERA-ABAN, M.; LIN, S.; BALL, A.; SCHOLE, P.; GREENING, G.E. Sensitive multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal noroviruses in clinical and environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.5464-5470, 2007.

WOLF, S.; HEWITT, J.; LIN, S.; RIVERA-ABAN, M.; BALL, A.; SCHOLE, P.; SVILL, M.; GREENING, G.E. Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. **Veterinary Microbiology**, v.133, n.1-2, p.184-189, 2009.

WOODE, G.N.; BRIDGER, J.C. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. **Journal of Medical Microbiology**, v. 11, p.441-452, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Diarrhoeal Diseases** (Updated February 2009). Disponível em: <<http://www.who.int/>>. Acesso em 29 maio 2009.

WYATT, R.G.; DOLIN, R.; BLACKLOW, N.R.; DUPONT, H.L.; BUSCHO, R.F.; THORNHILL, T.S. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. **The Journal of Infectious Diseases**, v.129, n.6, p.709-714, 1974.

ZAHORSKY, J. Hyperemesis hemis or the winter vomiting disease. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v.46, p.391-395, 1929.

ZHENG, D.P.; ANDO, T.; FANKHAUSER, R.L.; BEARD, S.; GLASS, R.I.; MONROE, S.S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology**, v.346, p. 312 -323, 2006.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Detectar e determinar a caracterização do Norovírus suíno (PoNoV) em amostras de fezes de suínos assintomáticos, na fase de terminação, provenientes de rebanhos da região oeste do estado do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de RT-PCR para a detecção parcial do gene que codifica a proteína (VP1) do capsídeo do PoNoV em *pool* de amostras de fezes de suínos;
- Determinar a frequência de amostras fecais e de rebanhos suínos positivos para o PoNoV;
- Realizar a caracterização molecular de algumas estirpes virais de PoNoV identificadas na região oeste do estado do Paraná.

3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO*

*artigo redigido sob as normas de publicação do periódico *Research in Veterinary Science*, disponível em:
www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623070/authorinstructions

ORIGINAL RESEARCH PAPER**High frequency of porcine Norovirus detection in finishing units of Brazilian pig-production systems**

P. F. N. Silva, A. F. Barry, N. R. Gardinali, C. S. Valente, A. F. Alfieri, A. A. Alfieri*

Laboratory of Animal Virology, Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário, PO Box 6001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil.

*Corresponding author: Phone 55 43 3371 5876; Fax 55 43 3371 4485

Email address: alfieri@uel.br

Abstract. Norovirus (NoV) is a member of the *Caliciviridae* family and is considered as an emerging human enteric pathogen. NoV is also detected in farm animals such as cattle, pig, and sheep. Porcine NoV (PoNoV) is widespread around the world, but low frequency of infection is observed. We evaluated pooled stool samples ($n=112$) of asymptomatic adult pigs for PoNoV presence in 16 pig finishing herds located in Paraná state, Brazil. The RT-PCR assay was performed using porcine specific primers targeting a conserved capsid region. The PoNoV was identified in 14 (87.5%) of the evaluated herds and in 58 (51.8%) of the stool samples. The phylogenetic analysis of sequences ($n=7$) allowed to cluster six wild-type Brazilian PoNoV strains in genogroup II genotype 11 (GII-11) and one strain in GII-19. These results show that PoNoV is widespread in the investigated pig farms and that a high frequency of infection exists.

Key-words: Swine, adult, non-diarrheic, calicivirus, norovirus, RT-PCR, sequencing

INTRODUCTION

Norovirus (NoV) comprises a genus that belongs to the *Caliciviridae* family and have been described in human and animal hosts (Scipioni et al., 2008). The noroviruses are associated with a variety of diseases in several host species and are the major cause of human non-bacterial gastroenteritis worldwide, including the cases associated with water and food-borne outbreaks. Sporadic outbreaks of illness usually occur in restaurants, schools, home cares, hospitals, shelters, and cruise ships (World Health Organization - WHO, 2009).

NoV has also been found in farm animals such as cattle, pig and sheep (Woode and Bridger, 1978; Sugieda et al., 1998; Wolf et al., 2009). Bovine NoV infections include clinical signs such as diarrhea and may occur in naturally infected or in experimentally inoculated calves (Woode and Bridger, 1978; Bridger et al., 1984). Differently, the importance of porcine noroviruses in the development of diarrhea is not well established in this animal species (Wang et al., 2007).

Members of the *Caliciviridae* family are small, round, non-enveloped viruses, with an icosahedral capsid and a 7.5kb, positive-sense, single-stranded, polyadenylated RNA genome. The caliciviruses contains four recognized genera: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus*, and *Norovirus* (ICTV, 2009). In addition, other animal viruses (*Nebovirus* [bovine], *Valovirus* [swine], and Tulane-like virus [rhesus monkey]) are also potential members of this family (Smiley et al., 2002; Farkas et al., 2008; L'Homme et al., 2009b).

The genome of NoV is organized into three open reading frames – ORFs. ORF 1 encodes a polyprotein that origins six non-structural proteins after autocleavage. ORF 2 and ORF 3 encode two structural proteins denominated, respectively, as VP1, the major capsid protein, and VP2, a protein with function in packing the genome into virions (Donaldson et al., 2008).

Based on the complete sequence of VP1, noroviruses are classified into five genogroups (GI – GV) and subdivided in clusters or genotypes. The human NoV strains are located in GI, II, and IV; the porcine viruses belongs to GII, close to human strains; the bovine and ovine isolates are in GIII; the recently detected canine and lion NoV were classified in GIV, and the murine NoV is in the GV genogroup (Zheng et al., 2006).

The detection of NoV from asymptomatic adult pigs in the Australasia region, Europe, North America, and Latin America and the widespread presence of NoV antibodies within pig herds, raises public health concerns about zoonotic transmission of PoNoV to humans (van der Poel et al., 2000; Farkas et al., 2005; Wang et al., 2005a; Mattison et al, 2007; Reuter et al., 2007; Wolf et al., 2007; Mauroy et al., 2008; Keum et al., 2009; L'Homme et al., 2009a; Mijovsky et al., 2009; Shen et al., 2009; Cunha et al., 2010).

PoNoV strains have been classified in the same genogroup (GII), along to with the most prevalent human noroviruses isolates. The GII PoNoV strains detected to date are distributed in three clusters (genotypes) denominated GII-11, -18, and -19 (Wang et al., 2007).

Epidemiological studies have demonstrated the widespread occurrence of noroviruses in the swine-production systems worldwide (Wang et al., 2007). However, the role of the PoNoV infection in pigs in developing countries has not been established. Recently, a GII-18 PoNoV was found in a single stool sample collected in a pig farm in the Rio de Janeiro state, in southeast Brazil (Cunha et al., 2010). Additionally, a study demonstrated the widespread detection of another genus (porcine sapovirus) of the *Caliciviridae* family in piglets bred in several Brazilian geographical regions (Barry et al., 2008).

Despite of this, few information about noroviruses and sapoviruses circulation in Brazilian pig herds have been achieved. Considering the ramifications of public health, the

aim of this study was to evaluate the presence of PoNoV in asymptomatic finishing pigs in Brazilian pig herds in multi-site production systems.

MATERIALS AND METHODS

Herds

The pig herds were evaluated from the west region of Paraná state, Toledo district (24°42'49''S; 53°44'35''W). This region is one of the great Brazilian pork producing areas, with breeding of high animal density. The animals are bred in a multi-site production system with good nutritional and sanitary management practices, including the “all-in all-out” system in all pens. Sixteen finishing units were evaluated in the summer (2008; $n=7$) and in the winter (2009; $n=9$) seasons.

Fecal specimens and sampling

Pooled fecal samples ($n=112$) were collected in December 2008 ($n=41$) and June 2009 ($n=71$) from finishing pigs between 9 and 24-weeks old. Each pool of stool sample was constituted with 5-15 individual feces collected directly from pens and stored at 4°C until processing. All samples were collected from asymptomatic animals.

RNA extraction

RNA specimens were obtained from 400 μ L of 10-20% (w/v) fecal suspensions, prepared with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2. A combination of the

phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidinium isothiocyanate methods was performed according to Barreiros *et al* (2004). A sequenced wild-type Brazilian porcine NoV GII-11 strain with 90% of nucleotide identity with the SwNV/swine43/JP strain from an adult pig was used as positive control. For each RNA extraction, ultrapure sterile water was used as a negative control. Both negative and positive controls were included in all proceedings.

RT-PCR

The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was performed using porcine NoV primers SWNV₁ (forward; 5'-CGTACCAGAGGTCAACAAT-3'; nt 5124-5142) and SWNV₂ (reverse; 5'-AATCTAACAAAATCTCACCTG-3'; nt 5305-5285). This pair of primers was designed based on the SwNV/swine43/JP strain (GenBank accession no. AB126320) and targeted the N-terminal capsid genomic region of PoNoV (REUSKEN *et al.*, unpublished).

RT-PCR reactions were carried out with an initial denaturation of 10 μ L of extracted RNA added to 1 μ L DMSO (5% final concentration) and 1 μ L (20 pmol) pSWNV₂ at 97°C for 5 min. The samples were placed on ice for 5 min, and 8 μ L RT mix solution containing 1x RT buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.3; 3 mM MgCl₂; 75 mM KCl), 0.1 mM each dNTP (InvitrogenTM, USA), 10 mM DTT, 100 units of M-MLV reverse transcriptase (InvitrogenTM, USA), and ultrapure sterile water at a final volume of 20 μ L. After the initial RT reaction at 42°C for 30 min, a denaturation step was performed at 94°C for 5 min. The tubes were placed on ice and 5 μ L cDNA was added with 45 μ L PCR mix solution containing 1.5x PCR buffer (30 mM Tris-HCl pH 8.4; 75 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each primer (pSWNV₁/forward and pSWNV₂/reverse), 2.5 units of *Platinum* Taq DNA polymerase (InvitrogenTM, BRA) and ultrapure sterile water in a final volume of 50 μ L. The amplification

was performed in a thermocycler (PTC200, MJ Research Co., USA) with the following cycling profile: an initial denaturation step of 3 min at 94°C, followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 52°C, and 1 min at 72°C, and a final extension step of 10 min at 72°C. Aliquots of 5 µL of the RT-PCR products, with the expected size of 181 bp, were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis in TBE buffer (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA; pH 8.4), ethidium bromide (0.5 mg/mL) stained, and visualized under UV light.

Sequencing and sequence analysis

Amplicons were purified directly from the PCR products or extracted from the agarose gel with GFX™ PCR DNA and the Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Pittsburgh, USA) and quantified in a Qubit™ fluorometer using Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen™, Carlsbad, USA). MegaBACE™ 1000 and the DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare, Pittsburgh, USA) were used for sequencing, which was carried out with PCR forward and reverse primers. Electropherogram quality analysis was performed using Phred and CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) and similarity searches were conducted with sequences deposited in GenBank using BLAST. A multiple alignment and an identity matrix were produced in BioEdit Sequence Editor, version 7.0. The phylogenetic tree was generated using the Neighbor-Joining algorithm based on the Poisson correction model for deduced amino acids (aa) analysis with 1,000 replicates of bootstrapping using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 4. The sequences included in this study were acquired from the National Center for Biotechnology Information, USA (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>).

Statistical analysis

In order to verify the predominance of PoNoV circulation in the specific seasons, the comparison of proportions among the two periods of collection was performed using the program EpiInfo, version 6.04.

RESULTS AND DISCUSSION

An amplicon with a length of 181 bp from the PoNoV capsid gene was detected in 51.8% (58/112) of the stool samples from asymptomatic animals included in this study. The PoNoV was identified in fecal samples collected in both the summer (49%; 20/41) and winter (54%; 38/71) seasons. Seventy-two percent (5/7) of the Brazilian fattening farms visited in 2008 demonstrated NoV circulation and all ($n=9$) farms visited in 2009 were considered positive. The table 1 resumes the time and number of stool samples collection, the farms investigated, the age of animals and the positive stool samples for NoV circulation.

The infection was widely distributed in the evaluated herds, with 87.5% of the pig herds were found animals excreting NoV. A similar result was obtained in a study conducted by Wang et al. (2006b), who found 70% (42/60) of NoV infection in individual stool samples from a single fattening swine farm. This finding revealed that the spring season collection represented a NoV outbreak among U.S.A. finisher pigs.

Other studies also evaluated the presence of PoNoV in pooled stool samples (van der Poel et al., 2000; L'Homme et al., 2009a). Commonly, this strategy increases the virus detection rate. These previous studies verified PoNoV shedding in only 2.0% (2/100 adult pig farms) and 20.0% (5/22) of the herds from The Netherlands and Canada, respectively (van der Poel et al., 2000; L'Homme et al., 2009a). The results of the present study suggest that PoNoV is circulating in the evaluated pig herds at high levels.

No significant difference ($p=0.62$) was observed among the PoNoV infection frequency detected in the summer versus the winter seasons. In general, human noroviruses are associated with outbreaks that occur in the coldest and driest months of the year in the Northern Hemisphere countries (WHO, 2009). This pattern of infection is also noted in human rotaviruses. However, the increased incidence of disease, particularly due to rotaviruses, has not been verified in tropical countries such as the Brazil. In several studies carried out in South America, the human and animal rotavirus outbreaks are related to the low relative atmospheric humidity, although the illness is present throughout the whole year (Santos et al., 2008). The results of the present study show that the same infection profile can occur in porcine noroviruses in Brazilian pig herds.

Molecular diagnostics carried out in different countries have been established a worldwide distribution of NoV in pig-production systems (Sugieda et al., 1998; van der Poel et al., 2000; Wang et al., 2005; Reuter et al., 2007; Wolf et al., 2009; Mauroy et al., 2008; Keum et al., 2009; L'Homme et al., 2009a; Mijovsky et al., 2009; Shen et al., 2009; Cunha et al., 2010). Several NoV epidemiological studies show a relatively low prevalence of porcine noroviruses, ranging between no detection (Martínez et al., 2006; Barry et al., 2008; Martella et al., 2008) to a detection rate of 20% (Wang et al., 2006b). However, in this study, we found a high rate of animals and herds positive for PoNoV. Several factors might have influenced our results, such as i) the sampling method used for stool sample collection, in a pooled form directly from pens; ii) the age of the pigs, with feces collection only from adult pigs; and iii) the pair primers used in the RT-PCR assay.

The majority of NoV epidemiological approaches using the RT-PCR assay for porcine fecal samples employ the “universal” calicivirus pair primers p289/290, designed for detection of the conserved region of the RdRp gene of human NoV and sapovirus (SaV) strains. This primer pair was originally developed for NoV detection from human stool

samples. However, satisfactory results were obtained in fecal samples of animal origin (Atmar and Estes, 2001; Wang et al., 2007).

The primers used in the RT-PCR assay for PoNoV detection differ in some studies, some of which were carried out with primers designed specifically for virus strains of porcine origin (Keum et al., 2009; L'Homme et al., 2009a; Mauroy et al., 2008; Wang et al., 2006a,b). Despite this, published data that employed specific primers for PoNoV strains also found a low rate of NoV infection in South Korea (1.9%) (Keum et al., 2009) and Belgium (4.6%) (Mauroy et al., 2008).

According to Wang *et al* (2007), multiple factors may affect the sensibility and specificity of RT-PCR assays, one of which is primer selection. L'Homme *et al* (2009a) revealed that the nucleotide alignments of primers p289/290 show significant disagreement between different PoNoV strains. They also demonstrated that this pair of primers failed to amplify two PoNoV GII-11 strains, which were detected with oligonucleotides developed for strains of porcine origin.

In addition, Wang *et al* (2006a) compared the detection spectrum and detection limits for p290 and p289 or p110 primers, with specific primers designed for porcine noroviruses. Although p290/110 revealed the broadest reactivity for PoNoV or SaV strains, lower sensitivity was achieved compared to the PoNoV specific primers for the detection of genetically diverse PoNoV strains (Wang et al., 2006a).

In this study, we report a RT-PCR assay with primers that target the capsid gene of PoNoV for screening in stool samples. The design of primers that encode other conserved regions of the NoV genome, including the 3' end of ORF1 (region B) and 5' end of ORF2 (region C), has been documented in some human noroviruses studies (Green et al., 1995; Noel et al., 1997; Vinjé et al., 2000; Kojima et al., 2002). The RT-PCR assay carried out in the

present study simplified the strategy for PoNoV detection and genotyping, whereas it did not require the use of other capsid primers for strain clustering in genogroups and genotypes.

Unlike the genetically heterogeneous human NV strains, PoNoV strains seem to be less variable, with only three GII genotypes were identified to date (GII-11, 18, and 19). Although the N-terminus of VP1 has been successfully used for genotyping human NoV strains, the targeting of a C-terminal capsid region (region D) is recommended for better NoV strains classification (Zheng et al., 2006). For this reason, the SWNV primers, that amplify a fragment of 181 bp length of the PoNoV VP1 gene were chosen for use in this survey.

For molecular characterization of some Brazilian wild-type PoNoV strains, nine amplicons were selected for sequencing analysis that showed good intensity of the bands as determined by ethidium bromide stained agarose gel. The PoNoV strains were identified in the samples collected in summer ($n=6$) and winter ($n=3$) seasons in nine different pig herds. A BLAST search analysis confirmed all ($n=9$) sequenced amplicons as PoNoV. A high similarity of these sequences with typical published PoNoV strains was obtained (data not shown).

The sequence of seven strains had enough quality to carry out the genotyping analysis. Based on a multiple alignment of Brazilian PoNoV strains and other NoV strains, the Brazilian UEL19, 23, 27, 65, 67, and 109 sequences shared 81-97% of nt identity with the previously reported GII-11 PoNoV (Sw43, Sw918, and VA34 strains) and 58-78% nt identity with human NoV sequences (GI, II and IV). In addition, they had 86-97% of nt identity with each other. The identity with other calicivirus genera (PEC-Cowden strain) was less than 40%.

From the seven Brazilian strains analyzed, five showed 100% and 57-75% of aa similarity with GII-11 PoNoV and human NoV strains, respectively. In addition, the Brazilian UEL19, 27, 65, 67, and 109 sequences had 100% similarity with each other. These samples

were from different age groups (9 to 24 weeks old), and were collected in different (summer and winter) seasons. The phylogenetic tree demonstrates that these five Brazilian strains clustered in GII-11, close to the Japanese and Netherlander strains (Figure 1).

Interestingly, the UEL23 strain, classified as GII-11, also demonstrated a high percentage of nt and aa identity (75 and 93%, respectively) with the GII-19 QW170 strain. The phylogenetic tree shows a branch of the GII-11 strains containing UEL23 (Figure 1). For better assessment of UEL23 genotyping, we calculated pairwise distance ranges based on aa sequences between some published porcine and human NoV strains, a SaV/PEC-Cowden and all Brazilian PoNoV strains (Table 2). According Zheng *et al* (2006), the classification of NoV in domains showed that UEL23 is only 3.1% distant to other Brazilian GII-11 and Sw918 sequences. Otherwise, UEL23 had distance of 6.3% compared to the GII-19 QW170 isolate. This analysis suggests that UEL23 is most closely related to sequences that belong to GII-11 (Table 2).

The UEL29 strain showed 70-76% nt identity with the Brazilian GII-11 sequences. Moreover, this strain had 75 to 76% nt identity with GII-11 PoNoV sequences and 81% with the GII-19 QW170 strain. In addition, UEL29 had 57-68% nt identity compared with human NoV isolates (GI, II and IV). Amino acid analysis of UEL29 revealed 87% similarity with the GII-19 QW170 strain. The phylogenetic tree demonstrated that the UEL29 sequence clustered in GII-19, close to the US strain (Figure 1). According Wang *et al* (2005), a GII-19 QW170 sequence is considered as a possible recombinant of a PoNoV GII-11 (Sw43-like) in the RdRp-capsid junction region. Recombination is an event that can occur between sequences belonging to the same genogroup. However, co-infection between different NoV genogroups strains in human has been previously (Wang *et al.*, 2007).

Epidemiological investigation of porcine caliciviruses is lacking in Latin American countries. Recently, Cunha *et al* (2010) described a PoNoV strain genotype II-18 in a finisher

pig from a farm in Rio de Janeiro state, in southeastern Brazil. We can now affirm that the three genotypes (GII-11, 18, and 19) of PoNoV strains described in the world are also present in Brazilian pig farms. These results highlight the importance of the epidemiological survey of animal noroviruses in the emergence of new NoV strains, or as reservoirs for human infections. The vesiviruses are the only member of the *Caliciviridae* family in which interspecies infections occur; however noroviruses and sapoviruses should not be excluded in future studies (Bank-Wolf et al., 2010).

CONCLUSION

In summary, we describe for the first time a high rate of NoV infections in Brazilian fattening pig farms. The Brazilian wild-type PoNoV strains clustered with other GII-11 and GII-19 porcine strains isolates with sequences available in a public database. Besides the interest in animal health, the characterization of genogroups and genotypes of PoNoV field strains is also of interest in light of public health concerns about the zoonotic transmission of PoNoV to human. Further studies involving PoNoV detection and genotyping in different Brazilian regions, or even in other countries in Latin America, may contribute to a better understanding of the epidemiology of animal caliciviruses in developing countries.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors do not have any financial and personal relationships with other organisations that could result in error bias in this work.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. van der Poel, who kindly provided the primer sequences used in this study and the Brazilian Institutes CNPq, CAPES, FINEP and Fundação Araucária for financial support. Alfieri A.A. and Alfieri A.F. are recipient of CNPq fellowships.

REFERENCES

Atmar, R.L., Estes, M.K., 2001. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews* **14**, 15-37.

Bank-Wolf, B.R., König, M., Thiel, H.J., 2010. Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Veterinary Microbiology* **140**, 204-212.

Barreiros, M.A.B., Alfieri, A.F., Médici, K.C., Leite, J.P.G., Alfieri, A.A., 2004. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to calves vaccinated against NCDV (P1G6) rotavirus strain. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **51**, 104-109.

Barry, A.F., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2008. Detection and phylogenetic analysis of porcine enteric calicivirus, genetically related to the Cowden strain of sapovirus genogroup III, in Brazilian swine herds. *Brazilian Journal of Veterinary Research* **28**, 82–86.

Bridger, J.C., Hall, G. A., Brown, J. F., 1984. Characterization of a calici-like virus (Newbury agent) found in association with astrovirus in bovine diarrhea. *Infection and Immunity*, **43**, 133-138.

Cunha, J.B., Mendonça, M.C.L., Miagostovich, M.P., Leite, J.P.G., 2010. First detection of porcine norovirus GII.18 in Latin America. *Research in Veterinary Science*, article in press, doi:10.1016/j.rvsc.2009.12.013.

Donaldson, E.F., Lindesmith, L.C., Lobue, A.D., Baric, R.S., 2008. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunological Reviews*, **225**, 190-211.

Farkas, T., Nakajima, S., Sugieda, M., Deng, X., Zhong, W., Jiang, X., 2005. Seroprevalence of noroviruses in swine. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**, 657–661.

Farkas, T., Sestak, K., Wei, C., Jiang, X., 2008. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *Journal of Virology*, **82**, 5408-5416.

Green, S.M., Lambden, P.R., Deng, Y., Lowes, J.A., Lineham, S., Bushell, J., Rogers, J., Caul, E.O., Ashley, C.R., Clarke, I.N., 1995. Polymerase chain reaction detection of small round-structured viruses from two related hospital outbreaks of gastroenteritis using inosine-containing primers. *Journal of Medical Virology*, **45**, 197-202.

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

International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV. Access in 10 jul.2009. The Universal Virus Database of the International Committiee on Taxonomy of Viruses. Available in:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>>.

Keum, H., Moon, H., Park, S., Kim, H., Rho, S., Park, B., 2009. Porcine noroviruses and sapoviruses on Korean swine farms. *Archives of Virology*, **154**, 1765–1774.

Kojima, S., Kaheyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N., Katayama, K., 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *Journal of Virological Methods*, **100**, 107-114.

L'Homme, Y., Sansregret, R., Plante-Fortier, E., Lamontagne, A.M., Lacroix, G., Ouardani, M., Deschamps, J., Simard, G., Simard, C., 2009a. Genetic diversity of porcine Norovirus and Sapovirus: Canada, 2005-2007. *Archives of Virology*, **154**, 581-593.

L'Homme, Y., Sansregret, R., Plante-Fortier, E., Lamontagne, A., Ouardani, M., Lacroix G., Simard, C., 2009b. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes*, **39**, 66-75.

Martella, V., Bányai, K., Lorusso, E., Bellacicco, A.L., Decaro, N., Mari, V., Saif, L., Costantini, V., De Grazia, S., Pezzotti, G., Lavazza, A., Buonavoglia, C., 2008. Genetic heterogeneity of porcine enteric caliciviruses identified from diarrhoeic piglets. *Virus Genes*, **36**, 365-373.

- Martínez, M.A., Alcalá, A.C., Carruyo, G., Botero, L., Liprandi, F., Ludert, J.E., 2006. Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. *Veterinary Microbiology*, **116**, 77-84.
- Mattison, K., Shukla, A., Cook, A., Pollari, F., Friendship, R., Kelton, D., Bidawid, S., Farber, J.M., 2007. Human Noroviruses in Swine and Cattle. *Emerging Infectious Diseases*, **13**, 1184-1188.
- Mauroy, A., Scipioni, A., Mathijs, E., Miry, C., Ziant, D., Thys, C., Thiry, E., 2008. Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium. *Archives of Virology*, **153**, 1927–1931.
- Mijovski, J.Z., Poljsak-Prijatelj, M., Steyer, A., Barlic-Maganja, D., Koren, S., 2009. Detection and molecular characterization of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. *Infection, Genetics and Evolution*, article in press, doi:10.1016/j.meegid.2009.11.010.
- Noel, J.S., Ando, T., Leite, J.P., Green, K.Y., Dingle, K.E., Estes, M.K., Seto, Y., Monroe, S.S., Glass, R.I., 1997. Correlation of patient immune responses with genetically characterized Small Round-Structured Viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990-1995. *Journal of Medical Virology*, **53**, 372-383.
- Reuter, G., Biro, H., Szucs, G., 2007. Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary. *Archives of Virology*, **152**, 611–614.

Santos, J.S., Alfieri, A.F., Leite, J.P.G., Skaraba, I., Alfieri, A.A., 2008. Molecular Epidemiology of the Human Group A *Rotavirus* in the Paraná State, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **51**, 287-294.

Scipioni, A., Mauroy, A., Vinjé, J., Thiry, E., 2008. Animal Noroviruses. *The Veterinary Journal*, **178**, 32-45.

Shen, Q., Zhang, W., Yang, S., Chen, Y., Ning, H., Shan, T., Liu, J., Yang, Z., Cui, L., Zhu, J., Hua, X., 2009. Molecular detection and prevalence of porcine caliciviruses in eastern China from 2008 to 2009. *Archives of Virology*, **154**, 1625–1630.

Smiley, J.R., Chang, K.O., Hayes, J., Vinjé, J., Saif, L.J., 2002. Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new genus. *Journal of Virology*, **76**, 10089-10098.

Sugieda, M., Nagaoka, H., Kakishima, Y., Ohshita, T., Nakamura, S., Nakajima, S., 1998. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Archives of Virology*, **143**, 215-221.

van der POEL, W.H., Vinjé, J., van Der Heide, R., Herrera, M.I., Vivo, A., Koopmans, M.P., 2000. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerging Infectious Diseases*, **6**, 36-41.

Vinje, J., Green, J., Lewis, D.C., Gallimore, C.I., Brown, D.W.G., Koopmans, M.P.G., 2000. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of Norwalk-like viruses. *Archives of Virology*, **45**, 223-241.

Xi, J.N., Graham, D.Y., Wang, K.N., Estes, M.K., 1990. Norwalk genome cloning and molecular characterization. *Science*, **250**, 1580-1583.

Wang, Q.H., Han, M.G., Cheetham, S., Souza, M., Funk, J.A., Saif, L.J., 2005. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases*, **11**, 1874–81.

Wang, Q.H., Changb, K.O., Hana, M.G., Sreevatsan, S., Saif, L.J., 2006a. Development of a new microwell hybridization assay and an internal control RNA for the detection of porcine noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, **132**, 135-145.

Wang, Q.H., Souza, M., Funk, J.A., Zhang, W., Saif, L.J., 2006b. Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**, 2057–2062.

Wang, Q.H., Costantini, V., Saif, L.J., 2007 Porcine enteric caliciviruses: Genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *Vaccine*, **25**, 5453–5466.

Wolf, S., Hewitt, J., Lin, S., Rivera-Aban, M., Ball, A., Scholes, P., Savill, M., Greening, G.E., 2009. Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Veterinary Microbiology*, **133**, 184-189.

Woode, G.N., Bridger, J.C., 1978 Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *Journal of Medical Microbiology*, **11**, 441-452.

World Health Organization - WHO. Diarrhoeal Diseases (Updated February 2009). Access in 29 may 2009. Available in: <<http://www.who.int/>>.

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

LEGEND OF FIGURE

Figure 1: Neighbor-joining phylogenetic tree based on a 42-deduced amino acid capsid sequence of wild-type Brazilian porcine norovirus strains (UEL 19, 23, 27, 29, 65, 67 and 109 in boldface) and some published NV strains. A porcine *Sapovirus* strain (PEC-Cowden) was used as the outgroup. Accession numbers for the strains used in the analysis are human Norwalk (M87661), human Lordsdale virus (X86557), bovine Newbury Agent 2 (AF097917), human Alpatron (AF195847), murine MNV1 (AY228235), porcine Sw918 (AB074893), porcine Sw43 (AB074892), porcine VA34 (AY077644), porcine OH-QW101 (AY823304), porcine OH-QW170 (AY823306) and porcine PEC-Cowden (AF182760). The tree was constructed by the method of MEGA 4 using the Poisson correction model. The confidence values at the nodes were obtained by performing 1.000 bootstrap analysis.

TABLES

Table 1 – Detection of porcine norovirus (PoNoV) in pooled stool samples in finishing pigs of multi-site production systems of Brazilian pig herds by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), targeting the N-terminal capsid genomic region of PoNoV.

Collection	Farm	Fecal Sample		Age (week)
		Total	Positive (%)	
Summer*	A	6	4 (66.7)	12
	B	5	0	13
	C	6	0	17
	D	6	5 (83.3)	18
	E	6	6 (100.0)	21
	F	6	3 (50.0)	23
	G	6	2 (33.3)	24
Winter*	H	7	4 (57.1)	9
	I	7	1 (14.3)	12
	J	9	5 (55.6)	13
	K	5	1 (20.0)	15
	L	6	3 (50.0)	17
	M	10	5 (50.0)	19
	N	6	5 (83.3)	21
	O	4	2 (50.0)	23
P	17	12 (70.6)	24	
Total		112	58 (51.8)	

(*): Collection: Summer (December, 2008); Winter (June, 2009)

Table 2 – Pairwise distance ranges of Brazilian norovirus sequences and some published porcine and human norovirus strains. A porcine sapovirus (PEC-Cowden) was used as the outgroup. Pairwise distance ranges were calculated by using the Poisson correction method, based on a porcine norovirus capsid fragment with a length 42 aa. Reference values for the Shell domain (N terminal capsid region) were as follows: for Strain (0-6.85); Cluster (3.65– 30.14); Genogroups (25.69– 48.86).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 Po/UEL19BRA																	
2 Po/UEL23BRA	3.1																
3 Po/UEL27BRA	0	3.1															
4 Po/UEL29BRA	16.4	16.4	16.4														
5 Po/UEL65BRA	0	3.1	0	16.4													
6 Po/UEL67BRA	0	3.1	0	16.4	0												
7 Po/UEL109BRA	0	3.1	0	16.4	0	0											
8 Hu/Norwalk virus	55.2	60.6	55.2	78.8	55.2	55.2	55.2										
9 Hu/Hawaii	27.8	31.8	27.8	50.1	27.8	27.8	27.8	50.1									
10 Po/Sw43	0	3.1	0	16.4	0	0	0	55.2	27.8								
11 Po/Sw918	0	3.1	0	16.4	0	0	0	55.2	27.8	0							
12 Po/VA34	0	3.1	0	16.4	0	0	0	55.2	27.8	0	0						
13 Po/QW101	20.1	23.8	20.1	36.1	20.1	20.1	20.1	55.2	20.1	20.1	20.1	20.1					
14 Po/QW170	3.1	6.3	3.1	12.9	3.1	3.1	3.1	55.2	31.8	3.1	3.1	3.1	20.1				
15 Bo/Newbury2	40.5	45.2	40.5	60.6	40.5	40.5	40.5	45.2	45.2	40.5	40.5	40.5	45.2	40.5			
16 Hu/Alphatron	27.8	31.8	27.8	45.2	27.8	27.8	27.8	55.2	40.5	27.8	27.8	27.8	23.8	27.8	45.2		
17 Mu/MNV1	45.2	45.2	45.2	60.6	45.2	45.2	45.2	60.6	50.1	45.2	45.2	45.2	40.5	45.2	36.1	36.1	
18 Po/SV/PEC Cowden	211	211	211	239.8	211	211	211	170.5	170.5	211	211	211	188.7	211	170.5	170.5	211

FIGURE

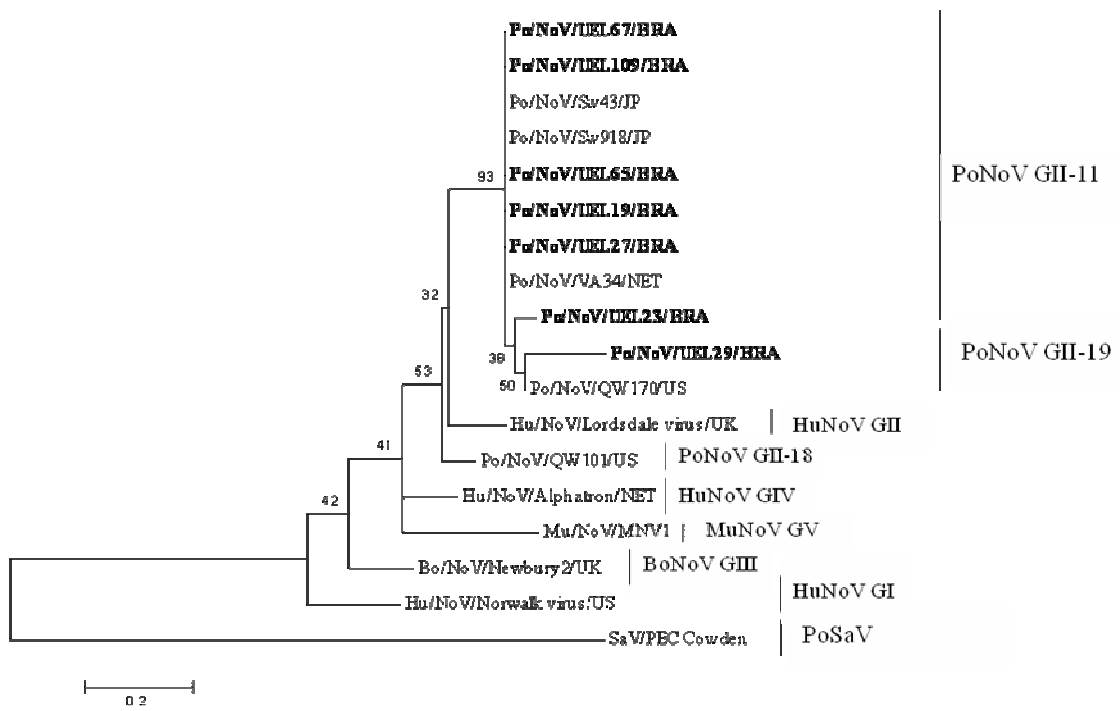


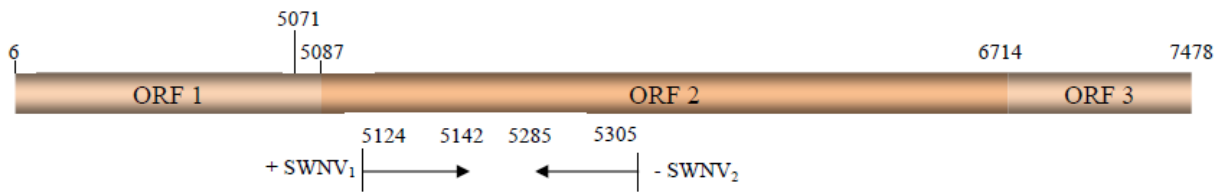
Figure 1

4 CONCLUSÕES

- A infecção pelo PoNoV está amplamente disseminada nos rebanhos e animais avaliados, provenientes da região sudoeste do estado do Paraná;
- A técnica de RT-PCR padronizada nesse estudo possibilitou a amplificação de um produto esperado de 181 -pb do gene VP1 do PoNoV em amostras fecais de suínos infectados e assintomáticos;
- Nas estirpes de PoNoV incluídas na análise filogenética foi possível observar a maior ocorrência do genotipo GII-11;
- A identificação de uma estirpe de PoNoV genotipo GII-19, em adição às outras estirpes virais GII-11, de mostra a diversidade molecular e antigênica das estirpes de PoNoV identificadas na região e período estudados.

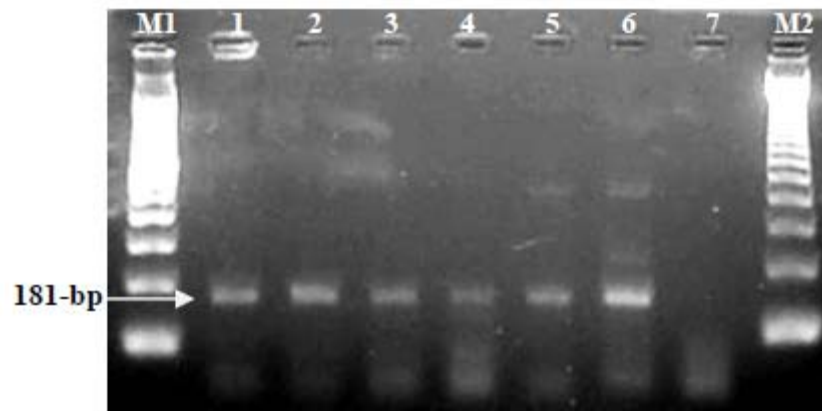
ANEXOS

ANEXO A



Localização dos *primers* SWNV₁ e SWNV₂ no sentido 5' — 3', utilizados neste estudo em relação ao genoma completo do Norovírus suíno, estirpe SwNV/swine43/JP (número de acesso no GenBank AB126320). Os números representam a posição dos nucleotídeos.

ANEXO B



Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo dos fragmentos apresentando 181 -pb (seta) dos produtos de RT-PCR que amplificam parcialmente o gene do capsídeo do norovírus suíno presentes em amostras fecais de animais de terminação. Linha M1 e M2: marcador molecular de 100-pb (M1) e 123-pb (M2); linha 1: controle positivo; linhas 2 -6: amostras de fezes positivas; linha 7: controle negativo (água ultrapura autoclavada).

ANEXO C

Matriz de identidade baseada em um fragmento de 142 nucleotídeos do capsídeo do norovírus suíno

	Hu/Norwalk	Hu/Hawaii	Po/Sw43	Po/Sw918	Po/VA34	Po/QW101	Po/QW170	Hu/Alphatron	PEC Cowden	Po/UEL19	Po/UEL23	Po/UEL27	Po/UEL29	Po/UEL65	Po/UEL67	Po/UEL109
Hu/Norwalk	ID	0,595	0,639	0,639	0,625	0,625	0,625	0,58	0,375	0,595	0,58	0,61	0,573	0,639	0,617	0,647
Hu/Hawaii	0,595	ID	0,776	0,776	0,776	0,761	0,761	0,656	0,426	0,708	0,679	0,746	0,694	0,783	0,768	0,783
Po/Sw43	0,639	0,776	ID	0,947	0,94	0,768	0,843	0,671	0,352	0,888	0,865	0,895	0,761	0,977	0,94	0,955
Po/Sw918	0,639	0,776	0,947	ID	0,917	0,783	0,85	0,671	0,352	0,835	0,813	0,873	0,753	0,94	0,902	0,94
Po/VA34	0,625	0,776	0,94	0,917	ID	0,776	0,85	0,664	0,367	0,888	0,88	0,895	0,761	0,962	0,94	0,97
Po/QW101	0,625	0,761	0,768	0,783	0,776	ID	0,805	0,701	0,375	0,738	0,686	0,738	0,753	0,768	0,776	0,783
Po/QW170	0,625	0,761	0,843	0,85	0,85	0,805	ID	0,746	0,36	0,798	0,753	0,798	0,813	0,835	0,85	0,85
Hu/Alphatron	0,58	0,656	0,671	0,671	0,664	0,701	0,746	ID	0,352	0,626	0,589	0,641	0,679	0,656	0,641	0,664
PEC Cowden	0,375	0,426	0,352	0,352	0,367	0,375	0,36	0,352	ID	0,338	0,345	0,338	0,397	0,36	0,367	0,367
Po/UEL19	0,595	0,708	0,888	0,835	0,888	0,738	0,798	0,626	0,338	ID	0,894	0,924	0,738	0,895	0,917	0,888
Po/UEL23	0,58	0,679	0,865	0,813	0,88	0,686	0,753	0,589	0,345	0,894	ID	0,872	0,708	0,873	0,895	0,865
Po/UEL27	0,61	0,746	0,895	0,873	0,895	0,738	0,798	0,641	0,338	0,924	0,872	ID	0,738	0,902	0,895	0,917
Po/UEL29	0,573	0,694	0,761	0,753	0,761	0,753	0,813	0,679	0,397	0,738	0,708	0,738	ID	0,761	0,753	0,753
Po/UEL65	0,639	0,783	0,977	0,94	0,962	0,768	0,835	0,656	0,36	0,895	0,873	0,902	0,761	ID	0,947	0,977
Po/UEL67	0,617	0,768	0,94	0,902	0,94	0,776	0,85	0,641	0,367	0,917	0,895	0,895	0,753	0,947	ID	0,947
Po/UEL109	0,647	0,783	0,955	0,94	0,97	0,783	0,85	0,664	0,367	0,888	0,865	0,917	0,753	0,977	0,947	ID

ANEXO D

Matriz de identidade baseada em um fragmento de 42 aminoácidos do capsídeo do norovírus suíno

	Hu/Norwalk	Hu/Hawaii	Po/Sw43	Po/Sw918	Po/VA34	Po/QW101	Po/QW170	Hu/Alphatron	PEC Cowden	Po/Uel19	Po/Uel23	Po/Uel27	Po/Uel29	Po/Uel65	Po/Uel67	Po/Uel109
Hu/Norwalk	ID	0,606	0,575	0,575	0,575	0,575	0,575	0,575	0,181	0,575	0,545	0,575	0,454	0,575	0,575	0,575
Hu/Hawaii	0,606	ID	0,757	0,757	0,757	0,818	0,727	0,666	0,181	0,757	0,727	0,757	0,606	0,757	0,757	0,757
Po/Sw43	0,575	0,757	ID	1	1	0,818	0,969	0,757	0,121	1	0,969	1	0,848	1	1	1
Po/Sw918	0,575	0,757	1	ID	1	0,818	0,969	0,757	0,121	1	0,969	1	0,848	1	1	1
Po/VA34	0,575	0,757	1	1	ID	0,818	0,969	0,757	0,121	1	0,969	1	0,848	1	1	1
Po/QW101	0,575	0,818	0,818	0,818	0,818	ID	0,818	0,787	0,151	0,818	0,787	0,818	0,696	0,818	0,818	0,818
Po/QW170	0,575	0,727	0,969	0,969	0,969	0,818	ID	0,757	0,121	0,969	0,939	0,969	0,878	0,969	0,969	0,969
Hu/Alphatron	0,575	0,666	0,757	0,757	0,757	0,787	0,757	ID	0,181	0,757	0,727	0,757	0,636	0,757	0,757	0,757
PEC Cowden	0,181	0,181	0,121	0,121	0,121	0,151	0,121	0,181	ID	0,121	0,121	0,121	0,09	0,121	0,121	0,121
Po/Uel19	0,575	0,757	1	1	1	0,818	0,969	0,757	0,121	ID	0,969	1	0,848	1	1	1
Po/Uel23	0,545	0,727	0,969	0,969	0,969	0,787	0,939	0,727	0,121	0,969	ID	0,969	0,848	0,969	0,969	0,969
Po/Uel27	0,575	0,757	1	1	1	0,818	0,969	0,757	0,121	1	0,969	ID	0,848	1	1	1
Po/Uel29	0,454	0,606	0,848	0,848	0,848	0,696	0,878	0,636	0,09	0,848	0,848	0,848	ID	0,848	0,848	0,848
Po/Uel65	0,575	0,757	1	1	1	0,818	0,969	0,757	0,121	1	0,969	1	0,848	ID	1	1
Po/Uel67	0,575	0,757	1	1	1	0,818	0,969	0,757	0,121	1	0,969	1	0,848	1	ID	1
Po/Uel109	0,575	0,757	1	1	1	0,818	0,969	0,757	0,121	1	0,969	1	0,848	1	1	ID

ANEXO E

Normas de publicação do periódico *Research in Veterinary Science*:

The Official Journal of the Association for Veterinary Teaching and Research Work

Research in Veterinary Science publishes original contributions and review articles on research concerning the health and disease of animals, including studies in comparative medicine.

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Short Communications
3. Review articles

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Short Communications should not exceed 1600 words and include no more than two tables or figures. They should have an abstract but no other divisions. Typescripts should be clearly marked Short Communication.

Review articles Review articles on veterinary topics are invited for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4000 words.

Submission of manuscripts

Submission to *Research in Veterinary Science* now proceeds online via Elsevier Editorial System - o+<http://ees.elsevier.com/rvsc>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being

considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Language Editing: Elsevier's Authors Home provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For

more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Ethics

Before papers describing animal studies are accepted for publication in *Research in Veterinary Science*, the authors must satisfy the editors that the work conformed to appropriate ethical standards. Whether or not a particular piece of work is accepted for publication will be decided by the editors whose decision will be final.

The authors should provide written assurances that: (i) The project underwent ethical review and was given approval by an institutional animal care and use committee or by appropriately qualified scientific and lay colleagues. (ii) The care and use of experimental animals complied with local animal welfare laws, guidelines and policies.

The editors expect authors to have adhered to the following general principles: (i) Alternative procedures that replace the use of animals should be used if possible. Where this is not possible, the animals used should be carefully selected to be the least sentient species possible and of an appropriate strain. (ii) The minimum number of animals should be used consistent with achieving the scientific objectives of the study. (iii) Pain and distress should be minimised by the use of humane endpoints, sedation, anaesthesia, analgesia and postoperative care. (iv) Access to veterinary care must be available at all times. (v) Investigators and personnel that care for and use animals must be trained and possess relevant expertise and training that should be updated regularly. (vi) If animals have to be killed, this should be done humanely according to local euthanasia regulations, such as the Home Office guidelines in the UK or guidelines of the American Veterinary Association Panel on Euthanasia.

Title

Papers should be headed with the full title, the initials and surnames of the authors, and the name and address of the institution where the work was carried out. The full telephone number, Fax number and e-mail address of the corresponding author should also be provided.

Form of Papers

- a) Abstract (not more than 150 words), self-contained and embodying the main conclusions. It should note the relevance to veterinary science as well as the aims and objectives of the work. Sentences such as 'the results are discussed', which merely describe the paper, are not allowed.
- b) Keywords. Please supply a list of up to six keywords that describe the paper.

- c) Introduction.
- d) Materials and methods employed.
- e) Results, as concise as possible. Text, tables and figures illustrating the same data will rarely be permitted.
- f) Discussion and conclusions.
- g) Acknowledgements.
- h) References.
- i) Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing**, throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscripts, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Abbreviation and symbols: Authors are asked to explain each scientific abbreviation at its first occurrence in their papers; for example, complement fixation test (CFT). The policy of the journal with respect to units and symbols is that SI (System International) symbols should be used.

Reference Format

Only papers closely related to the author's work should be mentioned; exhaustive lists should be avoided. References should be cited in the text thus: Brown and Smith (1985), Jones (1987a), Jones (1987b), or Smith *et al* (1988). The list of references at the end of the paper should be given in alphabetical order and should appear in the form:- Torgerson, P.R., Budke, C.M., 2003 *Echinococcosis* - an international public health challenge. Research in Veterinary Science **74**, 191-202. References to books and monographs should include: (1) author(s) or editor(s); (2) year of publication; (3) title; (4) edition; (5) place of publication and publisher;

(6) beginning and final

page numbers.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.
Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, email healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage & <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)

- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit [Q+http://www.elsevier.com/fundingbodies](http://www.elsevier.com/fundingbodies)).

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from [o+http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html](http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html). Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: [Q+http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win](http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win). If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Author Enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the journal's homepage at <http://www.elsevier.com/locate/rvsc>. This also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Lista de Reagentes

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 uL; 25umol each (100 mM dATP Solution, 100 mM Dctp Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies®)
2. 10 x PCR-Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies®)
3. 5x First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375mM KCl, 15 mM MgCl₂) (Invitrogen Life Technologies®)
4. 123 bp DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies®)
5. Acetona, P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
6. Ácido acético glacial, P.A. (CH₃COOH) P.M. 60,05 (Nuclear®)
7. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83
8. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
9. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico - EDTA, P.A.(C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂2H₂O) P.M. 372,24 (Reagen®)
10. Agarose (Gibco BRL®)
11. Água DEPC (Dietyl pirocarbonato) (Invitrogen Life Technologies®)
12. Álcool etílico absoluto (C₂H₂OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
13. Álcool isoamílico (CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth®)
14. Azul de bromofenol (Sigma®)
15. Brometo de etídeo (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma®)
16. Cloreto de Magnésio 50 mM (MgCl₂) (Invitrogen Life Technologies®)
17. Cloreto de Potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)
18. Cloreto de Sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)
19. Clorofórmio, P.A. (CHCl₃) P.M. 119,38 (Dinâmica®)
20. Didhiothreitol - 10 mM DTT (Invitrogen Life Technologies®)
21. Dimetilsulfóxido - DMSO (Invitrogen Life Technologies®)

22. Dodecil Sulfato de Sódio - Lauril Sulfato de Sódio - SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) P.M. 288,38 (Synth®)
23. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth®)
24. Fosfato de sódio monobásico ($NH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) P.M. 155,99 (Reagen®)
25. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL®)
26. Hidróxido de Sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Mallinckrodt Chemicals®)
27. Hidroximetil amino metano - Tris 99% P.M. 121,14 (Inlab®)
28. Metanol, P.A. (CH_3OH) P.M. 32,04 (Allkimia®)
29. M-MLV Reverse Transcriptase - 200 units/ μ L (Invitrogen Life Technologies®)
30. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) SwNoV1 (forward) e SwNoV2 (reverse) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®)
31. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies®)
32. Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen Life Technologies®)
33. Sacarose, P.A. - sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) p.m. 342,31 (Reagen®)
34. Silicon dioxide (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma®)
35. Triton x-100

APÊNDICE B – Soluções e Tampões

• **Hidratação da sílica**

- 60 g de sílica (SIGMA®)
- Adicionar 500 mL de água MilliQ autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 horas
- Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 horas para sedimentar
- Desprezar 440 mL do sobrenadante
- Adicionar 600 µL de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (pH=2,0)
- Aliquotar e autoclavar

• **Fenol ácido / clorofórmio - álcool isoamílico (25:24:1)**

- 25 mL fenol saturado em água (pH ácido)
- 24 mL clorofórmio
- 1 mL álcool isoamílico

• **Solução L6**

- 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de Tris-HCl 0,1 M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 mL de Triton x 100
- Água bidestilada qsp. 1 litro

• **Solução L2**

- 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de Tris-HCl 0,1 M pH 6,4
- Água bidestilada qsp. 1 litro

- **Tampão de Amostra**

- Azul de bromofenol 0,25%
- Sacarose - sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 45%
- 100 mL Água bidestilada

- **Tampão de corrida: TBE (Tris - Ácido bórico - EDTA) 10 x []**

- 0,89 M Tris
- 0,89 M ácido bórico
- 0,02 M EDTA
- Água

bidestilada qsp.

1 litro pH = 8,4

- **Tampão fosfato salina (PBS)**

- 137 mM cloreto de sódio (NaCl)
- 3 mM cloreto de potássio (KCl)
- 8 mM sódio fosfato dibásico anidro (Na_2HPO_4)
- 15 mM potássio fosfato monobásico (KH_2PO_4)
- Água DEPC

qsp. 500mL pH

= 7,2

APÊNDICE C – Protocolo de Técnicas

• **Extração do ácido nucleico pela associação das técnicas fenol ácido/clorofórmio/álcool isoamílico e sílica/isotiocianato de guanidina**

A) Preparo da suspensão fecal (10 a 20%)

- Colocar em um tubo 100 μ L ou 100 mg de fezes
- Adicionar 500 μ L de água DEPC
- Vortexar
- Centrifugar a 2.000x g/5 min
- Utilizar 400 μ L do sobrenadante para a extração

B) Extração

- Adicionar 50 μ L de SDS 10%
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56°C/20 min
- *Spin* (Centrifugar 10.000 x g 30/seg)
- Adicionar 400 μ L de fenol ácido clorofórmio álcool isoamílico
- Incubar em banho-maria à 56°C/15 min
- Homogeneizar manualmente por 15 seg
- Centrifugar 10.000 x g/10 min
- Recolher sobrenadante em outro tubo
- Adicionar 500 μ L de solução L6
- Adicionar 25 μ L de sílica hidratada
- Homogeneizar em vórtex
- Agitar durante 30 min em temperatura ambiente
- *Spin*
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 μ L de solução L2
- Homogeneizar em vórtex

- *Spin*
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 500 μ L de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- *Spin*
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 1.000 μ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- *Spin*
- Desprezar o sobrenadante
- Adicionar 1.000 μ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- *Spin*
- Desprezar o sobrenadante
- Adicionar 1.000 μ L de acetona PA gelada
- Homogeneizar em vórtex
- *Spin*
- Desprezar o sobrenadante
- Secar o pellet em banho-maria a 56°C/15 min
- Adicionar 100 μ l de água DEPC
- Homogeneizar em vórtex
- Descansar em banho-maria à 56°C/15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g/4 min
- Recolher o sobrenadante
- Estocar a -20°C

• **Transcrição reversa (RT) seguida da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação parcial do gene que codifica a VP1 do Norovírus suíno**

A) Desnaturação

- Em banho de gelo, adicionar 10 μL do RNA a 2 μL de *primer* mix (1 μL de pSwNoV₂ e 1 μL de DMSO [5% concentração final]) em um tubo para microcentrífuga
- Homogeneizar em vórtex
- *Spin*
- Colocar os tubos em termociclador a temperatura 97°C/5 min
- Colocar os tubos em banho de gelo por 5 min

B) RT

- Em banho de gelo, adicionar 8 μL de mix RT (4 μL de 5x First-Strand Buffer, 2 μL de DTT, 1 μL de dNTP, 0,5 μL de água ultrapura autoclavada e 0,5 μL M-MLV) ao desnaturado
- Homogeneizar em vórtex
- *Spin*
- Colocar os tubos em termociclador a temperatura 42°C/30 min e 94°C/5 min

C) PCR

- Em banho de gelo, adicionar 5 μL do cDNA a 45 μL de mix PCR (29 μL de água ultrapura autoclavada, 7,5 μL de 10 x PCR-Buffer, 4 μL de dNTP, 2 μL de MgCl₂, 1 μL de cada primer SwNoV1 e SwNoV2 e 0,5 μL de *Platinum* Taq DNA Polymerase)
- Homogeneizar em vórtex
- *Spin*

- Colocar os tubos em termociclador a temperatura 94°C/3 min, seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 min a 52 °C e 1 min a 72 °C. Para extensão final, são necessários 10 min a 72°C

- Estocar o produto a -20°C

• **Gel de agarose a 2%**

- 1 g de agarose

- 50 mL TEB 1 x

- 30 µL brometo de etídio

• **Purificação (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare®)**

- Faça um gel de agarose a 2%

- Pese um tubo para microcentrifuga e anote o peso

- Sob luz U.V., use uma lâmina limpa de bisturi para cortar a banda de interesse do gel de agarose, colocando-a no tubo

- Pese o tubo contendo a banda de agarose e calcule o peso do pedaço de gel

- Adicione 10 µL de tampão de captura tipo 3 por 10 mg de pedaço de gel

- Misture por inversão e incube a 60 °C/15 a 30 min até que a agarose esteja completamente dissolvida e homogeneíze a cada 3 minutos.

- Para cada purificação que for realizada, coloque uma coluna em um tubo coletor

- *Spin*

- Transfira até 800 µL da amostra com tampão de captura tipo 3 para a coluna e o tubo coletor

- Incube por 1 min à temperatura ambiente

- Centrifugue a coluna e o tubo coletor 7.500x g/1 min

- Descarte o fluido do tubo coletor. Coloque a coluna novamente no tubo coletor

- Adicione 500 µL do tampão de lavagem tipo 1 à coluna

- Centrifugue a coluna e o tubo coletor 7.500x g/1 min
- Descarte o tubo coletor e transfira a coluna a um novo tubo para microcentrífuga
- Adicione 25 μL de tampão eluidor tipo 6 para a membrana central da coluna e o tubo coletor
- Incube por 1 min à temperatura ambiente
- Centrifugue a coluna e o tubo coletor 7.500x g/2 min
- Estoque o purificado a -20°C

•Quantificação (Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit, Invitrogen Life Technologies®)

- Certifique-se de que todos os reagentes estejam em temperatura ambiente
- Solução de trabalho: adicionar Quant-iT Reagent (1x n μL) ao tampão Quanti-iT (199x n μL), onde n é o número de amostras mais o número de padrões
- Prepare os padrões em dois tubos diferentes, adicionando 190 μL da solução de trabalho e 10 μL de cada padrão (0 e 100) em cada tubo (volume final de 200 μL)
- Prepare as amostras, adicionando de 180-199 μL de reagente de trabalho e 1-20 μL do purificado, (volume final de 200 μL)
- Homogeneizar em vórtex
- Incube por 2 min à temperatura ambiente
- Fazer a leitura no fluorômetro Qubit™