



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

RAFHAELLA NOGUEIRA DELLA GUARDIA GONDIM

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE NOROVÍRUS, CO-INFECÇÕES E ESTADO
NUTRICIONAL DE CRIANÇAS EM ESTUDO CASO-CONTROLE
NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

FORTALEZA- CE
2017

RAFHAELLA NOGUEIRA DELLA GUARDIA GONDIM

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE NOROVÍRUS, CO-INFECÇÕES E ESTADO
NUTRICIONAL DE CRIANÇAS EM ESTUDO CASO-CONTROLE
NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

FORTALEZA- CE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G635d Gondim, Rafaella Nogueira Della Guardia.
DIVERSIDADE GENÉTICA DE NOROVÍRUS, CO-INFECÇÕES E ESTADO
NUTRICIONAL DE CRIANÇAS EM ESTUDO CASO-CONTROLE NO SEMIÁRIDO
BRASILEIRO / Rafaella Nogueira Della Guardia Gondim. – 2017.
104 f : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

1. Norovirus. 2. Variabilidade genética. 3. Recombinação. 4. Diarreia.
5. Região do semiárido brasileiro. I. Título.

CDD 610

RAFHAELLA NOGUEIRA DELLA GUARDIA GONDIM

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE NOROVÍRUS, CO-INFECÇÕES E ESTADO
NUTRICIONAL DE CRIANÇAS EM ESTUDO CASO-CONTROLE
NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Adelvane de Paulo Rodrigues
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Jones Anderson Monteiro Siqueira
Instituto Evandro Chagas (PA)

À Deus e minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a primeiramente a Deus por todo o amor, toda providência, todas as bênçãos na minha vida, na minha família e no meu trabalho.

Agradeço aos meus filhos, Daniel e Davi Gondim e meu esposo, Carlos Renato Gondim por serem a minha maior fonte de inspiração, muito obrigada por todo amor e carinho que vocês me dão todos os dias. Tudo é por vocês e para vocês.

Agradeço também, aos meus pais, Luzilene Nogueira e Luiz Carlos Della Guardia, aos meus irmãos Patrícia, Luiz Carlos, Giovanna, João Pedro e Leonardo Della Guardia, por toda intercessão e suporte diário. Vocês são partes de mim!

Agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, por sua paixão contagiante pela pesquisa, por ser exemplo de humildade e por fazer a diferença na vida de tantas crianças. Muito obrigada pela oportunidade me dada, pelo compartilhamento de tantos ensinamentos e pela sua confiança em mim para a realização desse trabalho.

Agradeço a toda equipe da FIOCRUZ/RJ nas pessoas da Dr^a. Marize Pereira Miagostovich e Dr. José Paulo Gagliardi Leite por me permitirem a realização desse trabalho. A todos que dedicaram um pouco do seu tempo e ensinamentos para me ajudar nessa jornada de aprendizado, de forma direta ou indireta.

O meu obrigada em especial ao Dr. Túlio Machado Fumian, por todos ensinamentos, paciência e por sempre acreditar que eu poderia alcançar meus objetivos. Por ter dedicado seu tempo a realização do meu sonho. Eu tenho toda a certeza que não estaria aqui sem seu auxílio.

Agradeço de forma especial a Lyvia Carneiro, e a todos que contribuíram diretamente no desenvolvimento e finalização do meu trabalho, são eles: Pedro Henrique Quintela, Mara Prata e Rafaela Pankov. Obrigada pela parceria, correções, discussões e paciência. Vocês serão sempre especiais na minha vida.

Agradeço aos meus colegas de laboratório LDI / LTM e a toda equipe do INCT, UPC-IBIMED pelo compartilhamento de conhecimentos, pelas companhias nos almoços e por terem ajudado no meu crescimento científico e pessoal.

Agradeço a coordenação e secretaria da Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFC, Prof. Dr. Pedro Bruin, Ivone e Rita pela eficiência e por sempre estarem disponíveis no esclarecimento de qualquer dúvida ou questionamento.

Agradeço a FUNCAP, pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos os envolvidos de alguma forma no projeto RECODISA, seja no treinamento dos participantes, na coleta das amostras e dados, e principalmente, aos responsáveis e crianças participantes do estudo, por terem contribuído no avanço dessa pesquisa científica.

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram diretamente, ou indiretamente, a continuar prosseguindo nessa jornada da pós-graduação.

A todos vocês, MUITO OBRIGADA!

“Provai e vede quão suave é o Senhor.
Feliz o homem que tem nele o seu refúgio.”
(Salmo 33)

RESUMO

A infecção por Norovirus (NoV) é um importante problema de saúde pública mundial devido a altas taxas de morbi-mortalidade. No entanto, o impacto ocasionado pelo NoV no desenvolvimento infantil permanecem pouco descritos. O presente estudo investigou a diversidade genética de cepas de NoV circulantes em crianças no semiárido brasileiro e suas associações como o estado clínico/nutricional e coinfeções. O estudo caso-controle foi realizado em seis diferentes cidades com crianças de 2-36 meses de idade durante o período de abril de 2010 a março de 2011. Foram considerados casos, as crianças que tiveram pelo menos um episódio de diarreia nos últimos 14 dias. A detecção e quantificação de NoV foram realizadas por RT-qPCR, seguidas de análises moleculares e filogenéticas. A taxa de detecção de NoV foi de 45,2% (75/166) e variou de 8% a 77,7% entre as cidades avaliadas. Um menor índice de escores z foi associado a presença de NoV, em peso por idade – WAZ ($P = 0,034$), peso por altura – WHZ ($P = 0,033$) e índice de massa corporal por idade – BAZ ($P = 0,033$). Além disso, a infecção por NoV foi associada à sintomas respiratórios mais frequentes ($P = 0,0096$). GII.P7 (genótipo da polimerase) e GII.3 (genótipo do capsídeo) foram os genótipos de NoV mais frequentes, e a análise da junção de ORF 1-2 identificou cepas recombinantes de NoV em 80% (12/15) das amostras sequenciadas. No que diz respeito às co-infecções, observou-se que as infecções por *Escherichia coli* enteroagregativa ($P = 0,0046$) foram mais frequentes na ausência de NoV, enquanto que na presença de Shigella observou-se uma correlação positiva com NoV ($P = 0,0199$). Entre os casos positivos para NoV, os episódios diarreicos foram associados à presença de *E. coli* enteroagregativa e ausência simultânea de *Cryptosporidium* e *E. coli* produtora de shiga toxina ($P = 0,0167$). O presente estudo demonstrou alta variabilidade genética de NoV circulantes no semiárido brasileiro e ressalta seu papel em relação a avaliação do estado nutricional infantil e coinfeções, contribuindo assim para uma melhor compreensão do seu impacto no desenvolvimento infantil e da sua epidemiologia.

Palavras-chave: Norovírus. Variabilidade genética. Recombinação. Diarreia. Pediatria. Estado nutricional. Região do semiárido brasileiro.

ABSTRACT

Norovirus (NoV) infection is a major global health problem with high incidence morbidity-mortality rates. However, the impact of NoV on child development remains poorly described. We wanted to investigate the genetic diversity of circulating NoV strains in children from the semiarid region of Brazil, and its associations with other co-infections and clinical/nutritional status. This case-control study was conducted in six different cities with children aged 2-36 months during the period from April 2010 to March 2011. Cases considered were children who had at least one episode of diarrhea in the last 14 days. Detection and quantification of NoV were performed by RT-qPCR, followed by molecular and phylogenetic analysis. The presence of NoV was 45.2% (75/166), and ranged from 8–77.7% among the cities examined. A lower z-score index was associated with the presence of NoV with weight for age – WAZ ($P = 0.034$), weight for height – WHZ ($P = 0.033$), and body mass index for age – BAZ ($P = 0.033$). In addition, NoV infection was associated with more frequent respiratory symptoms ($P = 0.0096$). GII.P7 (polymerase genotype) and GII.3 (capsid genotype) were the most frequent NoV genotypes, and analysis of the ORF 1-2 junction identified recombinant NoV strains in 80% (12/15) of the sequenced samples. With regards to co-infections, infections with enteroaggregative *Escherichia coli* ($P = 0.0046$) were more frequent in the absence of NoV, whereas in the presence of *Shigella* a positive correlation was observed with NoV ($P = 0.0199$). Among the positive cases of NoV, diarrheal episodes were associated with the presence of entero-aggregative *E. coli*, and simultaneous absence of *Cryptosporidium* and shiga toxin-producing *E. coli* ($P = 0.0167$). The present study highlighted the high genetic variability of NoV in the semiarid region of Brazil, and underlines its role in co-infections and infant nutritional status, thus contributing to better understandings of its impact on infant development and its epidemiology.

Key Words: Norovirus. Genetic variability. Recombination. Diarrhea. Pediatric. Nutritional status. Semiarid Brazilian region.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Microscopia eletrônica de partículas de Norovírus.....	18
Figura 2 –	Ilustração da estrutura do genoma de Norovírus.....	20
Figura 3 –	Classificação de Norovírus em 7 genogrupos (GI-GVII).....	22
Figura 4 –	Mecanismo de evolução do Norovírus.....	24
Figura 5 –	A composição e o ciclo de vida dos Norovírus.....	26
Figura 6 –	Fluxograma de coleta das amostras.....	33
Figura 7 –	Regiões do semiárido brasileiro.....	34
Figura 8 –	Carga viral das amostras fecais.....	41
Figura 9 –	(A) Análise Filogenética baseada na porção do gene da polimerase.....	43
	(B) Análise Filogenética baseada na porção do gene do capsídeo.....	44
Figura 10 –	Análises de <i>Simplot</i> and <i>Boostcan</i> dos Norovirus recombinantes detectados (A) GII.P16-GII.3 (B) GII.P7-GII.6.....	45
Figura 11 –	Distribuição sazonal das amostras de Norovírus do estudo.....	46
Figura 12 –	Patógenos detectados na presença e ausência de Norovírus em amostras fecais.....	47
Figura 13 –	Árvore de análise de classificação e regressão de coinfeções (CART) em amostras positivas de Norovírus.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Seleção dos participantes do estudo.....	35
Tabela 2	– Iniciadores usados no PCR para amplificação do genoma do Norovírus.....	37
Tabela 3	– Caracterização entre crianças casos e controles no semiárido brasileiro.....	39
Tabela 4	– Caracterização clínica das crianças do semiárido brasileiro.....	40
Tabela 5	– Presença de Norovírus e seus genogrupos.....	41
Tabela 6	– Distribuição de Norovírus nas cidades do estudo.....	42

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	– Comitê Nacional de Ética em Pesquisa.....	70
ANEXO B	– Comitê de Ética em Pesquisa da UFC.....	72
ANEXO C	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.....	73
ANEXO D	– QUESTIONÁRIO: Formulário Etiologia de Diarreia do Semiárido...	75
ANEXO E	– Manuscrito relacionado a dissertação “Genetic diversity of norovirus strains, co-infections and nutritional status in children: case-control study in the semiarid region of Brazil.”.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdV	Adenovírus
ANA	Agência Nacional de Águas
AstV	Astrovírus
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BAZ	Índice de Massa Corporal por Idade score Z
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
COMEPE/UFC	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará
DI	Dose Infectante
DP	Desvio padrão
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIE	Ensaio Imunoenzimático
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GA	Gastroenterite Aguda
gc	Cópias de genoma
HAZ	Altura-por-idade score Z
HBGA	<i>Histo-blood group antigens</i>
HuNoV	Norovírus Humanos
IC	Intervalo de confiança
ICTV	Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus (<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
IME	Imunomicroscopia Eletrônica
LDI	Laboratório de Doenças Infecciosas
LVCA	Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental

MAL-ED	A Etiologia, Fatores de Risco, as Interações de Infecções Entéricas e Desnutrição, e as suas Consequências na Saúde da Criança (<i>The Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health</i>)
MI	Ministério da Integração
MS	Ministério da Saúde
MuNoV	Norovírus Murinos
NCBI	Centro Nacional de Biotecnologia da Informação (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NJ	<i>Neighbor-joining</i>
NoV	Norovírus
OR	<i>Odds ratio</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
RdRp	RNA-polimerase dependente de RNA
RECODISA	Estudo da Etiologia da Diarreia Infantil em Crianças Provenientes da Comunidade Urbana em Fortaleza, CE, Brasil, e do Semiárido Brasileiro
RLA / ORF	Sequências de Leituras Abertas (<i>Open Read Frames</i>)
RT-PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real
RV	Rotavírus
RVA	Rotavírus do grupo A
SaV	Sapovírus
ST-EPEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica produtora de shiga toxina
TBE	Tris-borato-EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UFC	Universidade Federal do Ceará
UPC/IBIMED	Unidade de Pesquisas Clínicas/Instituto de Biomedicina
VLPs	Partículas Semelhantes a Vírus (<i>virus like particles</i>)
WAZ	Peso-por-idade escore Z
WHZ	Peso-por-altura escore Z

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Norovírus.....	18
2.1.1	Histórico.....	18
2.1.2	Epidemiologia.....	19
2.1.3	Genoma viral.....	20
2.1.4	Variabilidade genética e Recombinação.....	22
2.1.5	Replicação Viral.....	24
2.1.6	Diagnóstico.....	28
2.1.7	Tratamento.....	29
2.1.8	Controle de infecções.....	29
2.1.9	Vacinas.....	30
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo Geral.....	31
3.2	Objetivos Específicos.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Considerações éticas.....	32
4.1.1	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	32
4.1.2	Coleta.....	32
4.2	Desenho do estudo e definição de caso.....	33
4.3	Processamento das amostras.....	35
4.3.1	Extração de ácido nucléico.....	35
4.3.2	Detecção de Norovírus.....	36
4.3.3	Genotipagem de NoV.....	36
4.3.4	Análises de recombinações.....	37
4.4	Análise estatísticas.....	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	Características da População.....	39
5.2	Características Clínicas da População e Estado Nutricional...	40

5.3	Detecção de Norovírus.....	41
5.3.1	Quantificação do genoma viral.....	41
5.3.2	Distribuição entre as cidades.....	42
5.4	Sequenciamento e Análise Filogenética.....	42
5.5	Análises de Recombinação.....	44
5.6	Distribuição Temporal e Genótipos.....	46
5.7	Colinfecções.....	46
6	DISCUSSÃO.....	49
7	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	ANEXOS.....	70

1 INTRODUÇÃO

A doença diarreica é caracterizada por um deslocamento alterado de íons e água que seguem um gradiente osmótico, e pode ocorrer por meio de transportadores ou regulados por estreitas junções nos espaços laterais entre as células intestinais. Uma das causas comuns dessas alterações de deslocamento são as infecções ocasionadas por patógenos entéricos, que geram um desequilíbrio hidroeletrólítico podendo levar à doença diarreica (HODGES et al., 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a diarreia é definida como três ou mais evacuações líquidas ou semilíquidas em um período de 24 horas, ou mais evacuações do que o normal para cada indivíduo no mesmo período de tempo (WHO, 2013).

Em países em desenvolvimento, a ocorrência de casos de diarreia é mais preocupante, estima-se a ocorrência anual de 2,5 milhões de morte em crianças menores de cinco anos (BHUTTA et al., 2014). Sistemas de saneamento básico precário ou mesmo inexistente, desnutrição infantil e a carência em parâmetros de higiene básica são alguns dos fatores que contribuem para os altos índices de mortalidade e morbidade nesses locais (KOSEK et al., 2003).

Os vírus são importantes agentes etiológicos das doenças diarreicas, dentre eles, os mais relevantes são o rotavírus (RV), norovírus (NoV), astrovírus (AstV) e adenovírus entéricos (AdV) (GREEN et al., 2007, SANTOS et al., 2008). O NoV é responsável por mais de 90% dos surtos de gastroenterite viral aguda (GA) e cerca de 200.000 mortes por ano em todo o mundo, sendo a maioria em crianças de países em desenvolvimento (PATEL et al., 2008, LANATA et al., 2013).

Do ponto de vista clínico, as diarreias causadas por vírus dificilmente podem ser distinguidas daquelas causadas por bactérias, produzindo geralmente um processo autolimitado de diarreia e vômito, com duração aproximada de 1 a 7 dias (WILHELMI et al., 2003).

Doenças diarreicas frequentes podem acarretar o desenvolvimento de *déficits* físicos e cognitivos ainda na infância, além de predispor a doenças crônicas na vida adulta (GUERRANT et al., 2001 e 2013; THIELMAN et al., 2004). Nos últimos anos, algumas medidas, como a terapia de reidratação oral, a implementação da vacina contra RV e o investimento em saneamento básico, reduziram pela metade a mortalidade por diarreia, porém essa redução tem sido variável em diferentes regiões

do mundo (GALE et al., 2016). Não obstante tais melhorias, os números de morbidade das doenças diarreicas ainda permanecem bastante elevados (BARTELT et al., 2013).

Entre as regiões do Brasil, a prevalência e os índices de mortalidade por diarreias são bastante diversos. A região Nordeste possui um dos maiores indicadores de doenças diarreicas do país, principalmente por fatores como a falha na distribuição de saneamento básico, o baixo poder aquisitivo e o nível educacional dos pais e responsáveis nessa região (LIMA et al., 1992; MENDES et al., 2013). Nos últimos anos, foi relatada uma queda nos índices de mortalidade por doenças diarreicas na região Nordeste. No estado do Ceará, por exemplo, estes índices diminuíram de 102 mortes a cada 1000 nascimentos, em 1986, para 25 mortes a cada 1000 nascimentos, em 2006 (MACHADO et al., 2011); porém esse índice ainda é bastante superior ao valor aceitável pela OMS, que é de 10 mortes a cada 1000 nascimentos (WHO, 2013).

Estudo multicêntricos já foi realizado em países em desenvolvimento com o objetivo de revelar a etiologia das doenças diarreicas. O estudo de coorte MAL-ED (*The Etiology, Risk Factors, and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health*), foi realizado em oito países da Ásia, África e América do Sul, e acompanhou crianças a partir dos 17 dias de vida até os dois anos de idade. Este estudo avaliou a taxa de crescimento infantil, casos de diarreia e estado nutricional dessas crianças, tendo encontrado como patógenos mais prevalentes NoV GII (genogrupo II), RV, *Campylobacter* sp., AstV e *Cryptosporidium* sp. associados a doenças diarreicas no primeiro ano de vida. No segundo ano de vida, os patógenos mais prevalentes foram *Campylobacter* spp., NoV GII, RV, AstV e *Shigella* sp. (PLATTS-MILLS et al., 2015).

No Brasil, vários estudos têm sido realizados sobre a epidemiologia molecular do NoV a partir de crianças hospitalizadas, ambulatorios, creches (FERREIRA et al., 2012; FUMIAN et al., 2013; ANDRADE et al., 2014, SANTOS et al., 2017); entretanto, a maioria destes estudos foi limitada aos casos de GA. A região do Nordeste brasileiro, foi escolhida por possuir um dos maiores indicadores de doenças diarreicas do país, principalmente por fatores que incluíram a falta de saneamento básico, o baixo poder aquisitivo das famílias nessa região e o baixo nível educacional dos pais (LIMA et al., 1992; MENDES et al., 2013).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Norovírus

2.1.1 Histórico

NoV foi descrito a primeira vez em 1972, a partir de amostras oriundas de um surto ocorrido na cidade de Norwalk, Ohio, Estados Unidos da América (EUA), em 1968 (KAPIKIAN et al., 1972). A identificação do patógeno foi realizada por imunomicroscopia eletrônica (IME), em amostras de fezes e soro de um dos voluntários, que foram infectados via oral com filtrado de fezes proveniente de um adulto acometido no referido surto. Observou-se diversas partículas não envelopadas com diâmetro de 27 nm (**Figura 1**), semelhantes aos Rinovírus. O agente foi então denominado “Norwalk”, devido ao local onde foi registrado o primeiro surto e as partículas semelhantes identificadas posteriormente, foram denominadas “Norwalk like virus” (KAPIKIAN et al., 1972).

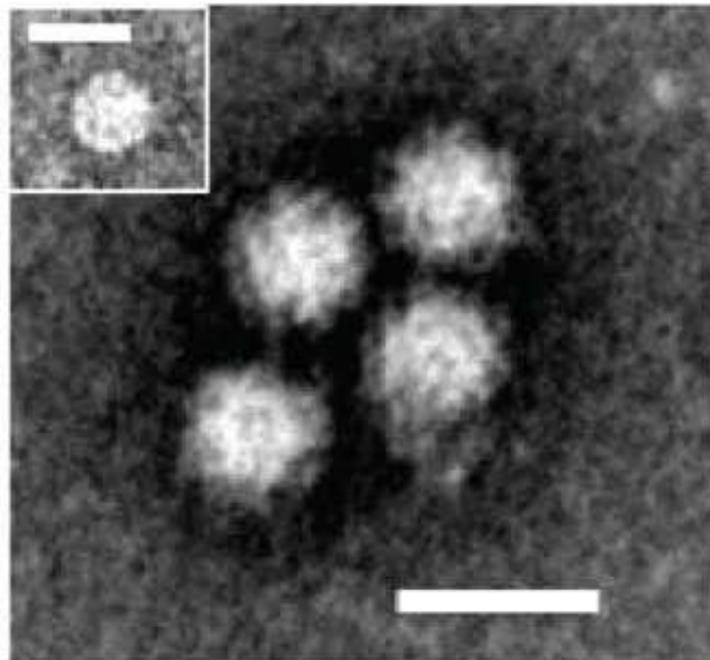


Figura 1 – Microscopia eletrônica de partículas de Norovírus oriundas de sobrenadante de enterócitos humanos infectados. Fonte: ettayebi et al. (2016).

Somente alguns anos depois, os “Norwalk virus” foram incluídos aos membros da família *Caliciviridae* por serem muito semelhantes a eles, além disso, o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis foram fundamentais para a detecção

deste agente, como os ensaios imunoenzimáticos (EIE) e a reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) (JIANG et al., 1990 e 1993).

Atualmente, o NoV pertence ao gênero *Norovirus* membro da família *Caliciviridae* que é formada pelos gêneros: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Nebovirus*, *Vesivirus* e *Lagovirus* (ICTV, 2016), além de cinco novos gêneros recentemente propostos - *Bavovirus*, *Nacovirus*, *Recovirus*, *Valovirus*, e *Secalivirus* (OKA et al., 2015). Os *Norovirus* e *Sapovirus* são vírus conhecidamente patogênicos para os humanos, entretanto, também possuem algumas variantes que infectam animais como bovinos, suínos, murinos, entre outros (GREEN et al., 2013).

2.1.2 Epidemiologia

Diversos estudos, em nível mundial, apontam a importância da vigilância de casos de infecção por NoV em casos esporádicos na comunidade. Em pesquisa conduzida na China, verificou-se prevalência de 28,5% de casos de NoV em crianças menores de cinco anos atendidas em unidades de atendimento ambulatorial (TAN et al., 2015). Na Nicarágua, em 2014, verificou-se um elevado número de casos de GA por NoV e SaV após a implementação da vacina contra RV (BUCARDO et al., 2014). Estima-se que somente nos EUA este vírus seja o responsável por 21 milhões de casos de GA todos os anos, culminado em mais de 70 mil hospitalizações e cerca de 800 mortes (HALL et al., 2012). Estudo de revisão e meta-análise analisando 175 artigos publicados no período de 2008-2014 revelou que prevalência média dos NoV no mundo está em torno de 18% (AHMED et al., 2014).

Estudo multicêntrico realizado em países em desenvolvimento, com crianças até 2 anos de idade, revelou que 89% destas apresentaram pelo menos uma infecção por NoV antes do segundo ano de vida (ROUHANI et al., 2016). Talal e colaboradores (2000) descreveram taxas de até 71% de soro-prevalência de NoV nessas mesmas amostras, em um estudo retrospectivo.

No Brasil, SÁ e colaboradores (2015) determinaram por meio de análises moleculares a prevalência de genótipos de NoV e RVA, além do perfil epidemiológico, de crianças até 10 anos que necessitaram de atendimento médico de emergência por diarreia infecciosa na cidade de Fortaleza, CE, revelando 17% de NoV e 12% de RVA, além do aparecimento de três casos de um genótipo de NoV GII ainda desconhecido, reforçando a importância de monitorização de novos casos de NoV e seus impactos

nos casos de diarreia infecciosa. Anteriormente, já havia sido realizado um estudo coorte com crianças provenientes de comunidades carentes e crianças hospitalizadas com diarreia recorrente, nessa mesma cidade, onde foi observada uma diversidade genômica dos NoV encontrados em casos esporádicos (PARKS et al., 1999).

2.1.3 Genoma viral

NoV possui RNA de cadeia simples, polaridade positiva, de aproximadamente 7,5 kb, organizado em três regiões de leitura aberta (RLA ou ORFs, do inglês, *Open Read Frames*) (**Figura 2**). A primeira região, chamada ORF1, está situada na extremidade 5', representa cerca de dois terços do genoma e codifica proteínas não estruturais incluindo RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp), enquanto que a ORF2 e a ORF3 codificam a principal proteína do capsídeo (VP1) e uma proteína estrutural menor (VP2), respectivamente. O capsídeo viral é composto principalmente pela proteína VP1 e algumas unidades da proteína VP2.

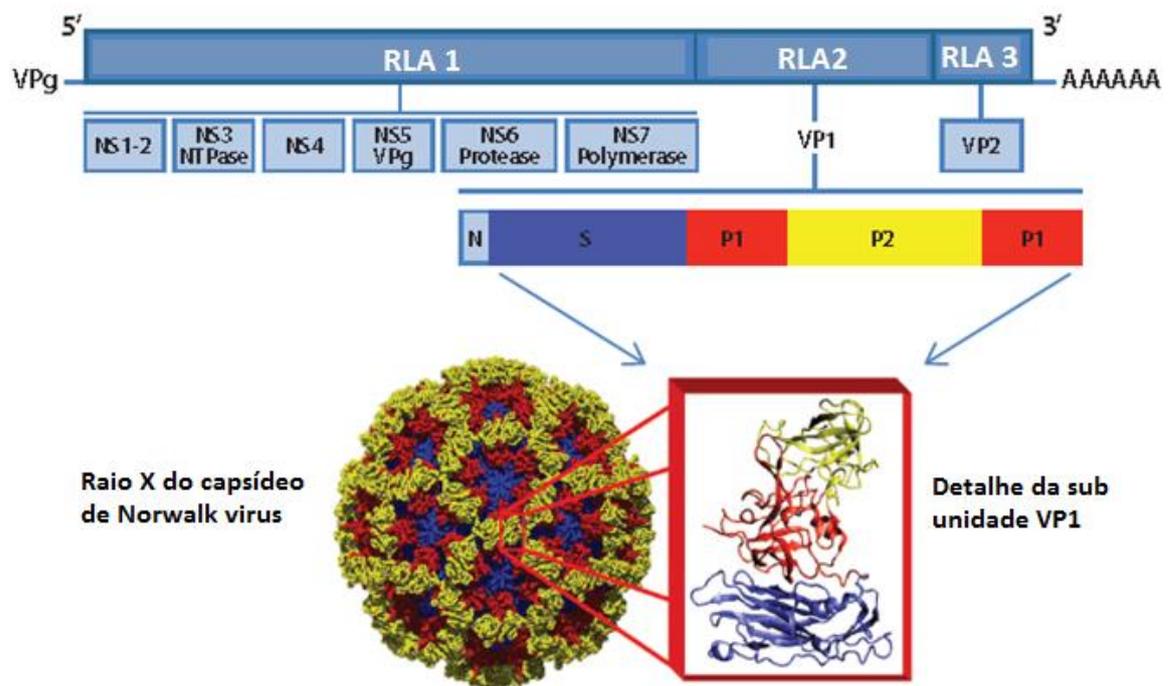


Figura 2 – Ilustração da estrutura do genoma dos Norovírus. Fonte: Adaptado de Iopman et al. (2015). O genoma do RNA dos NoV consiste em três regiões de leituras abertas (RLA): RLA 1, codifica seis proteínas não estruturais incluindo a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); RLA 2 codifica a principal proteína do capsídeo (VP1) que determina a antigenicidade do vírus e consiste em um domínio de shell (S) localizado na base do capsídeo e um domínio proeminente (P), que é subdividido em P1 e P2; e RLA 3 que codifica a menor proteína do capsídeo (VP2), que promove estabilidade à molécula.

As partículas de NoV não são envelopadas e possuem um nucleocapsídeo com tamanho de aproximadamente 30 nanômetros (nm) de diâmetro (GLASS et al., 2000, GREEN et al., 2013).

A proteína VP1 é a mais predominante do capsídeo viral, sendo a montagem deste independente de RNA ou mesmo da proteína VP2. VP1 localiza-se na região ORF2 e é composta pelos domínios *shell* (S) e *protruding* (P) (PRASAD et al., 1999, VONGPUNSAWAD et al., 2013). O domínio S é a estrutura que circunda o RNA e confere a morfologia icosaédrica ao vírion, sendo considerada a região mais conservada da proteína. O domínio P se projeta e forma as protuberâncias em forma de cálice, característica esta que gerou a denominação de família *Caliciviridae*. Este domínio P é subdividido ainda em subdomínios, P1 e P2, sendo a região P1 mais conservada (PRASAD et al., 1999, BERTOLOTTI-CIARLET et al., 2003, GREEN et al., 2007). O subdomínio P2, por sua condição mais variável, parece estar envolvido na interação patógeno-hospedeiro, pois algumas cepas variantes de NoV são capazes de se ligar à antígenos do grupo sanguíneo humano, estando envolvidos na susceptibilidade e resistência à infecção por estes agentes (MATSUI et al., 2000, GLASS et al., 2009, LI et al., 2012).

A região da ORF3 é composta pela menor das proteínas estruturais, a VP2, sabe-se que sua presença aumenta a eficiência da expressão de VP1, bem como a estabilidade das partículas produzidas (VONGPUNSAWAD et al., 2013). Embora encontrado em NoV purificados a partir de fezes de voluntários infectados, a VP2 não é essencial para a formação de partículas *like-virus* (VLPs) (BERTOLOTTI-CIARLET et al., 2002). Além disso, sabe-se também do seu envolvimento no processo de montagem do vírus durante o final da replicação (GLASS et al., 2000; SOSNOVTSEV et al., 2005).

A proteína VPg, apesar de estar presente na estrutura do vírion ligada covalentemente ao genoma, está envolvida no processo de transcrição e replicação viral (SOSNOVTSEV et al., 2000, GREEN et al., 2013).

Os NoV são classificados em genogrupos e genótipos, com base no agrupamento filogenético da sequência completa de aminoácidos da região do VP1 (ORF2). As cepas de NoV são classificadas em sete genogrupos (GI - GVII), e mais de 40 genótipos, dos quais, aqueles pertencentes ao GI, GII e GIV, são conhecidos por infectar humanos (**Figura 3**) (GREEN & HOA TRAN & KRONEMAN et al., 2013).

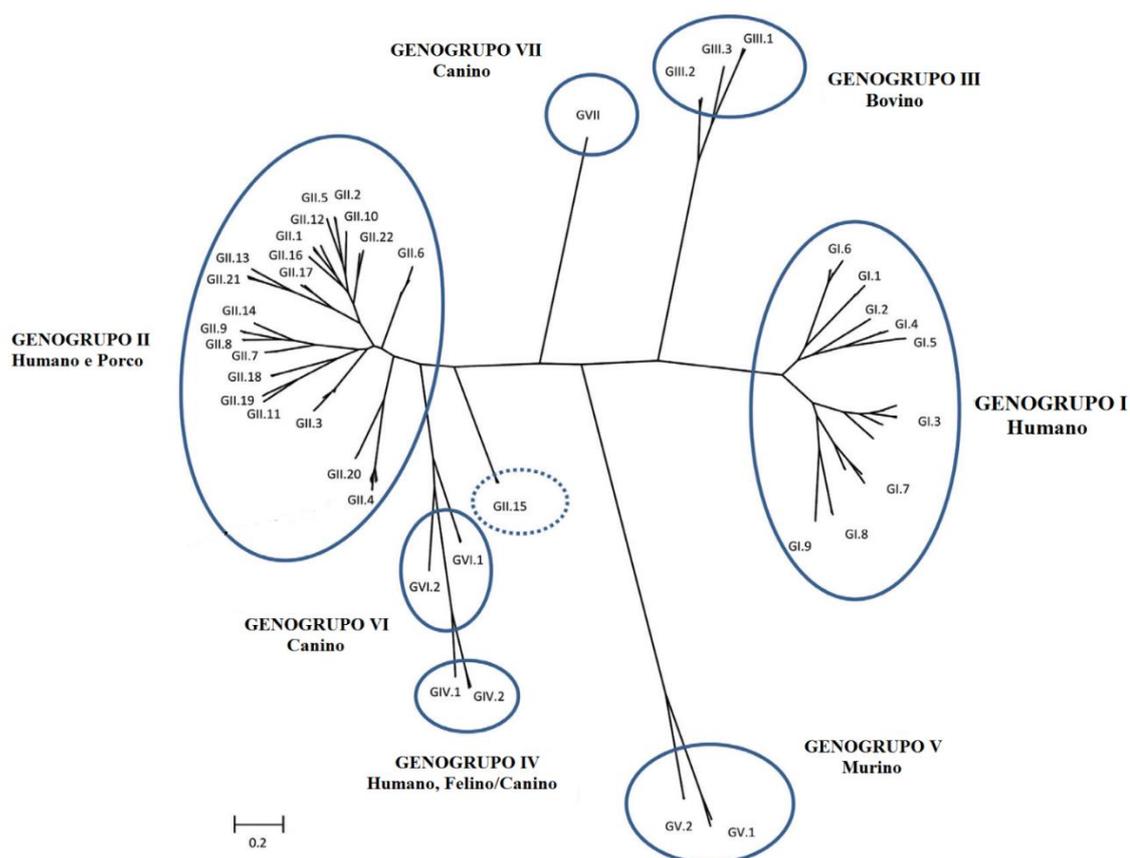


Figura 3 – Classificação de Norovírus em 7 genogrupos (GI-GVII), com base na sequência completa de aminoácidos da proteína do capsídeo - VP1. Fonte: Adaptado de Vinjé et al., (2015).

Diversas regiões alvo do genoma viral de NoV tem sido utilizadas para a sua caracterização molecular: A, B, C, D e E. NoV está em constante evolução por mutação pontual e recombinação genética. A alta frequência de recombinação entre diferentes genótipos, mais comumente próximos à junção RLA 1-2, levou a uma recomendação para ambas as regiões de genotipagem (BULL et al., 2007; KRONEMAN et al., 2013).

2.1.4 Variabilidade genética e Recombinação

Os NoV tem demonstrado, ao longo dos anos, possuírem uma grande variabilidade genética, provavelmente como resultado de processos adaptativos para manter-se no ambiente. Enquanto GII aparece como o genogrupos responsável pelo maior número de casos de surtos em humanos, o GI tem sido mais prevalente em contaminações ambientais (BON et al., 2005).

O genótipo GII.4 ainda é, atualmente, o maior responsável pelos casos de

GA por NoV, sendo identificado em 55-85% do total de casos registrados nos sistemas de saúde (RAMANI et al., 2014). Desde meados da década de 1990, as variantes da linhagem GII.4 causaram 62 a 80% dos surtos de NoV globalmente (SIEBENGA et al., 2009; DONALDSON et al., 2010). Além disso, seis variantes distintas de GII.4 foram associadas a epidemias globais de GA de 1996 até o presente e incluem US 1995/96 em 1996 (NOEL et al., 1999; WHITE et al., 2002), Farmington Hills em 2002 (LOPMAN & WIDDOWSON et al., 2004), Hunter em 2004 (BULL et al., 2006), 2006a e 2006b em 2007 e 2008 (EDEN et al., 2010), New Orleans de 2009 a 2012 (YEN et al., 2011), e mais recentemente, Sydney 2012 (VAN BEEK et al., 2013). Foram identificadas várias variantes GII.4 sazonais, incluindo Henry 2001, Japão 2001, Ásia 2003 e Apeldoorn 2008; no entanto, estas variantes foram associados a epidemias localizadas, em vez de uma pandemia global. Uma nova variante de GII.4 surge, a cada dois ou três anos, aumentando expressivamente a incidência de infecções por NoV (LOPMAN et al., 2015).

A recombinação de NoV humanos é frequentemente observada, além de ser um mecanismo importante pelo qual a diversidade genética é gerada (**Figura 4**). Eventos de recombinação constituem uma das mais importantes ferramentas de evolução dos vírus de RNA, tal como os NoV. A recombinação pode afetar a classificação filogenética, levar ao aumento da virulência das cepas virais e também dificultar o desenvolvimento de vacinas (BULL et al., 2007). Alguns autores sugerem que mutações aleatórias devem ter um impacto positivo na evolução do vírus e que pacientes imunocomprometidos podem funcionar como reservatórios para o surgimento de novas linhagens de NoV (VEGA et al., 2014).

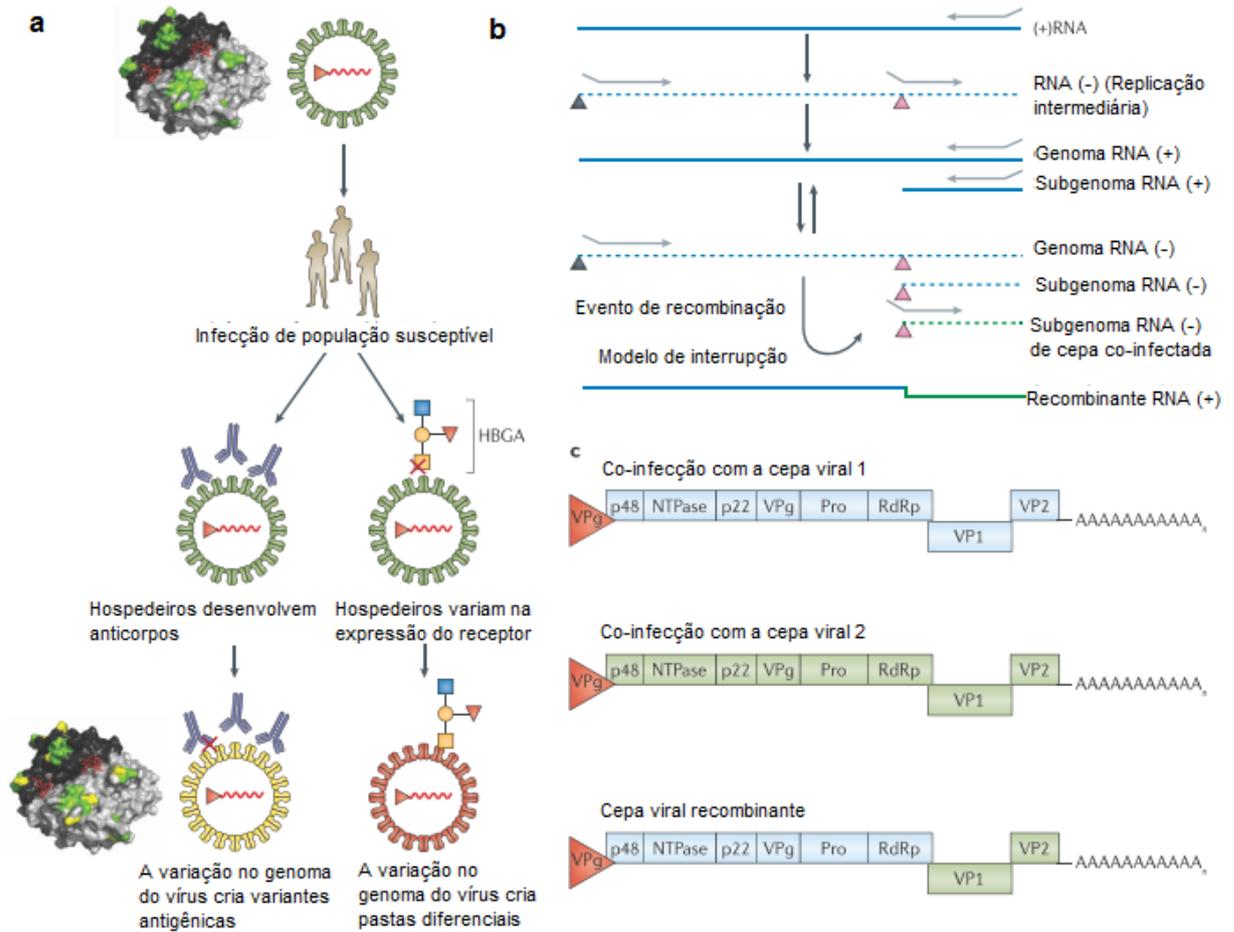


Figura 4 – Mecanismos de evolução do Norovírus. **(a)** A variação antigênica ocorre no domínio P do capsídeo do NoV. Um dímero do domínio P, com os sítios antigênicos A, D e E (verde), é demonstrado ligado aos antígenos do grupo *histo-blood* (HBGAs, vermelho), que são fatores de ligação da célula hospedeira para os NoV. O surgimento de novas variantes antigênicas de NoV é conduzido por deriva antigênica, que permite a evasão imune (via esquerda), ou por heterogeneidade na expressão de HBGAs na população humana (via direita). **(b)** A recombinação de NoV pode ocorrer por um mecanismo simples. O RNA viral genômico RNA (+) é transcrito em intermediários RNA (-) que fornecem modelos para a transcrição de síntese de RNA genômica e subgenômica (+). A recombinação ocorre quando a RNA-polimerase RNA-dependente (RdRp) inicia a síntese de RNA (+) no promotor (triângulo preto), localizado na porção 3' de um RNA (-) mas depois muda o modelo para um promotor subgenômico (triângulo rosa) do RNA (-) de um vírus co-infectante. **(c)** Após a recombinação, uma cepa de vírus recombinante é produzida com um RNA viral que possui uma nova combinação de ORF1 e ORF2-ORF3. Fonte: Adaptado de graaf et al., (2016).

2.1.5 Replicação Viral

A estratégia de replicação dos NoV ainda não está totalmente esclarecida, mas sabe-se que o melhor conhecimento deste sistema permitirá a avaliação do vírus, atualmente detectado por métodos moleculares, quanto a sua infecciosidade, e risco potencial à saúde humana (ETTAYEBI et al., 2016).

Atualmente sabe-se que a entrada da partícula viral nas células hospedeiras envolve ligação a carboidratos, sobretudo do tipo HBGA (*histo-blood group antigens*), que estão presentes na superfície celular de mucosas do corpo

humano (DONALDSON et al., 2010; RUVOËN-CLOUET et al., 2013). O crescimento de HuNoVs ocorre em todos os segmentos do intestino delgado detectados por replicação de RNA, indicando que enterócitos são o alvo principal para infecção e replicação (ETTAYEBI et al., 2016).

Inicialmente (**Figura 5**), a partícula viral interage com a célula hospedeira ligando-se a receptores vírus-específicos (HBGA) e permitindo a sua entrada no citoplasma celular. Em seguida, o genoma viral é liberado e inicia-se a tradução do RNA (mecanismo que envolve a VPg). A ORF 1 é então traduzida para produzir uma poliproteína não-estrutural. A tradução é mediada pelos fatores de tradução do hospedeiro que são recrutados pela proteína VPg não estrutural, que se liga covalentemente ao 5' do genoma. A poliproteína codificada por ORF1 é clivada pós-tradução, pela protease codificada por vírus, Pro, em proteínas individuais: p48, NTPase, p22, VPg, Pro e RNA-dependente RNA polimerase (RdRp). Ocorre uma interação com as proteínas celulares para dar origem a uma fita simples de RNA de polaridade negativa a partir da “fita molde”, formando então um RNA de fita dupla, a qual é então transcrita para dar origem a novas fitas simples de RNA, *sense* positivo e ao RNA subgenômico do NoV (mRNA). Os RNA subgenômicos (+) contêm apenas ORF2 e ORF3 e são utilizados para a produção de VP1 e VP2. Os processos seguintes, de montagem e saída de novas partículas virais, ainda são pouco conhecidos, embora evidências apontem que a apoptose e lise celular sejam mecanismos frequentes de liberação dos vírus (GREEN, 2007; THORNE et al., 2014; DE GRAAF et al., 2016).

Estudos demonstraram que todos os genótipos de NoV ligam-se aos HBGAs encontrados na superfície de células da saliva e da mucosa intestinal de indivíduos denominados secretores, salvo algumas exceções (KATO et al, 2015). Os indivíduos são classificados como secretores e não secretores conforme a expressão do gene fucosiltransferase 2 (FUT2), que transfere fucose para precursores de HBGA em células gastrointestinais de pacientes secretores positivos, correlaciona-se com a susceptibilidade a infecção com a maioria dos HuNoVs. Isso faz, em teoria, com que os indivíduos não secretores tenham menor chance de serem infectados por NoV do que os secretores. Entretanto, existem controvérsias sobre a influência do grupo sanguíneo na susceptibilidade à infecção ou no desenvolvimento da doença sintomática por NoV (ETTAYEBI et al., 2016).

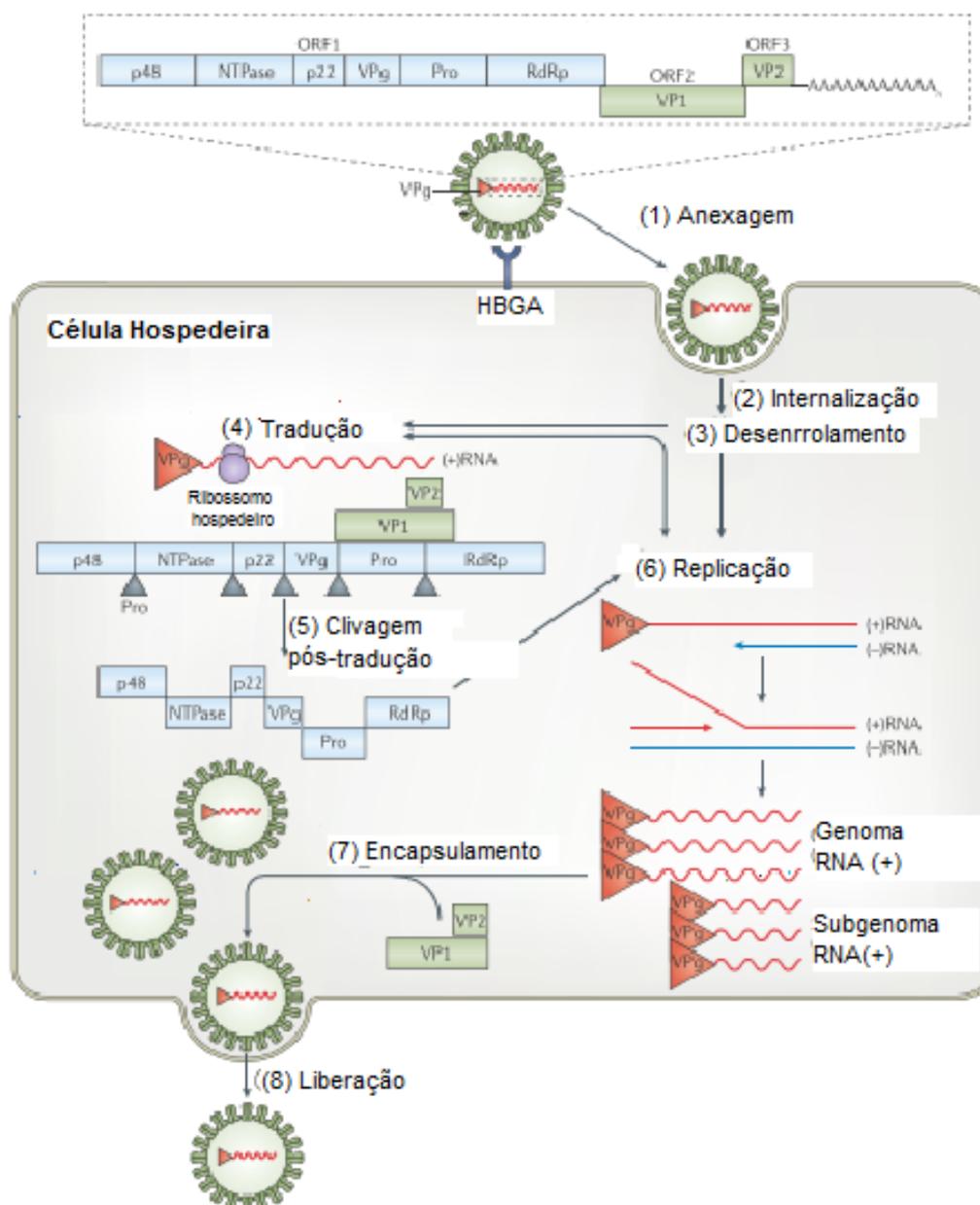


Figura 5 – A composição e o ciclo de vida dos Norovírus humanos. Etapas: (1) O cápsideo anexa-se à superfície celular através das interações entre VP1 e os antígenos do grupo HBGAs; (2) internalização; (3) desmontagem; (4) O RNA (+) é então transcrito e traduzido no citoplasma da célula hospedeira; (5) A poliproteína codificada por ORF1 é clivada pós-tradução; (6) Replicação de novos RNA genômicos e subgenômicos (+), respectivamente; (7) encapsulamento; (8) liberação de novos vírions. Fonte: Adaptado de graaf et al., (2016).

Os NoV são transmitidos pela via fecal-oral, através do contato pessoa-a-pessoa, ingestão de água ou alimentos contaminados ou através de fômites (GREEN et al., 2013). A transmissão pela ingestão de partículas aerossolizadas, provenientes de vômito também já foi reportada (CHADWICK et al., 1994, MARKS et al., 2003; O'NEILL et al., 2005, LOPMAN et al., 2011). Os NoV são ácido-resistentes, o que se reflete na sua estabilidade ao passarem pelo estômago e permanecerem infecciosos ao chegarem às vilosidades intestinais (GREEN et al., 2007).

A infecção por NoV tem geralmente um período de incubação de 24-48h e é caracterizada por aparecimento agudo de náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia sanguinolenta. Os sintomas clínicos tendem a durar de dois a três dias (ROCKX et al., 2002, GLASS et al., 2009). Outra característica notável do NoV é o elevado número de infecções assintomáticas (ROUHANI et al., 2016; O'RYAN et al., 2017), cerca de 30% das infecções por NoV são assintomáticas, mas esses indivíduos são capazes de transmitir o vírus, embora com títulos mais baixos que os sintomáticos (HALL et al., 2011).

Apesar da GA causada pelos NoV ser geralmente de intensidade média, a doença grave pode levar pacientes imunocomprometidos ou subnutridos ao óbito por causa da desidratação, que acomete principalmente crianças menores de cinco anos de idade e idosos maiores de 65 anos (SIMON & TSUGAWA et al., 2006; HARRIS et al., 2008). O sítio de replicação de HuNoVs em indivíduos imunocomprometidos é desconhecido, embora tenham sido observadas alterações histológicas em biópsias de voluntários infectados com o NoV (AGUS et al., 1973) e o antígeno foi detectado no duodeno, jejuno e em menor grau em enterócitos ileais de porcos infectados com um GII.4 HuNoV (CHEETHAM et al., 2006).

Os NoV são altamente infecciosos, devido à combinação de baixa dose infectante ($DI_{50} < 20$ partículas virais), alto nível de excreção viral (10^8 a 10^{10} cópias de RNA por grama de fezes) e excreção prolongada mesmo após recuperação clínica (LEE et al., 2007; TU et al., 2008).

Devido à dificuldade no estabelecimento de um sistema rotineiro de cultura de células para a replicação dos NoV humanos (HuNoV), a maioria dos dados obtidos se referem a estudos realizados com NoV murinos (MuNoV), que são cultiváveis, utilizados principalmente para obter-se informações quanto as características biológicas e propriedades de inativação do vírus (DUIZER et al., 2004; STRAUB et al., 2007). Porém, alguns estudos demonstraram que os MuNoV não são as variantes mais resistentes à inativação (PARK et al., 2006; WANG et al., 2012). Somente no último ano, a cultura celular e replicação de NoV humanos em enteróides derivados de células-tronco foi possível. Este sistema de cultura, recapitula o epitélio intestinal humano e permitirá estudos de hospedeiro-patógeno, de patógenos previamente não cultiváveis, além da avaliação de métodos para prevenir e tratar infecções por HuNoV (ETTAYEBI et al., 2016).

2.1.6 Diagnóstico

A dificuldade na cultura do modelo celular de NoV humanos por muitos anos dificultou o seu diagnóstico laboratorial, uma vez que o único método inicialmente disponível era a IME (requer profissionais qualificados, apresenta sensibilidade baixa, e custo elevado) (VINJÉ et al., 2015). No início dos anos 90, após estudos de clonagem e sequenciamento do genoma do vírus (JIANG et al., 1990), o NoV pode ser detectado em vômitos, swab retal e fezes, sendo esta última a amostra geralmente escolhida, por conter grande quantidade de partículas virais (VINJÉ et al., 2015). O aumento expressivo no número de casos impulsionou o desenvolvimento de testes mais rápidos e eficientes para a detecção deste vírus como os ensaios imunoenzimáticos (EIE) que apresentaram valores de sensibilidade próximos a 70%, com especificidade superior a 90%, sendo alternativas confiáveis para o diagnóstico rápido, principalmente em períodos de surtos. A dificuldade em desenvolver um EIE mais sensível está relacionada a grande variabilidade antigênica dos NoV (VINJÉ et al., 2015). Testes imunocromatográficos que geram resultados em cerca de 15 minutos também foram produzidos (AMBERT-BALAY et al., 2013), entretanto, apesar de alta especificidade (100%), a sensibilidade fica em torno de 35 a 52%, e sendo muito dependente do genótipo envolvido nos casos (AMBERT-BALAY et al., 2013).

O PCR em Tempo Real (Reação em Cadeia da Polimerase) é atualmente o método mais utilizado para diagnóstico de NoV (ATMAR et al., 2011). Essa metodologia apresenta vantagens sobre a PCR tradicional, como maior especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade, além disso, permitem o monitoramento em tempo real; ciclagens mais rápidas; menor quantidade de RNA nas reações de RT-PCR; e eliminam a manipulação do produto pós-PCR, reduzindo contaminações (VINJÉ et al., 2003). O sequenciamento dos NoV tem auxiliado nas investigações epidemiológicas, relacionando casos clínicos para determinação de fonte comum e para diferenciação de surtos que podem estar erroneamente relacionados (VINJÉ et al., 2003).

2.1.7 Tratamento

Esforços para desenvolver antivirais que tenham como alvo os estágios específicos do ciclo de replicação dos NoV estão em curso, mas a sua segurança e

eficácia clínica não foi ainda estabelecida (ROCHA-PEREIRA et al., 2010, KIM et al., 2011, KANKANAMALAGE & VASHIST et al., 2015). Replicons de HuNoV, são moléculas de RNA com a capacidade de auto replicação e constituem valiosas ferramentas para o estudo dos efeitos de drogas antivirais (THORNE et al., 2016).

O antiparasitário de amplo espectro Annita[®] (Nitazoxanida) é por muitas vezes utilizado para atenuar os sintomas das gastroenterites causadas por RV e NoV, propiciando uma redução do período sintomático da doença (ROSSIGNOL et al., 2006), embora seu uso não seja consenso. Porém, o mais comum é o tratamento diretamente relacionado aos sintomas apresentados, se fazendo necessário a terapia de reidratação, oral ou endovenosa, conforme a gravidade da desidratação (CDC, 2012). Medidas básicas de higiene e saneamento ainda são as ferramentas mais eficazes na diminuição da contaminação, no caso dos patógenos entéricos (BARCLAY et al., 2014).

2.1.8 Controle de infecções

O NoV permanece infeccioso por até 28 dias em condições ambientais mas pode ser inativado pelo calor (63°C por 30 minutos ou de 70°C por 2 minutos - temperaturas geralmente utilizadas para a pasteurização de laticínios) e ainda por radiação ultravioleta (UV). Anteriormente, acreditava-se que as partículas virais seriam resistentes ao tratamento com cloro em concentrações inferiores a 300 mg/L (DUIZER et al., 2004). No entanto, estudo mais recente, demonstrou que o tratamento com cloro na concentração de 189 mg/L foi eficiente na inativação do vírus (KINGSLEY et al., 2014). Entretanto, a quantidade preconizada pela portaria nº 2914 de 2011 do Ministério da Saúde (MS) recomenda que o teor residual de cloro na água seja entre 0,2 mg/L e 2 mg/L, concentração insuficiente para inativar partículas de NoV em caso de contaminação (MS/BRASIL, 2011).

A incapacidade prévia de cultivar HuNoVs prejudicou o desenvolvimento de estratégias para controlar e prevenir a infecção por HuNoV e determinação da eficácia dos métodos existentes para inativar o vírus para prevenir a transmissão em vários ambientes, inclusive em alimentos ou em superfícies contaminadas. A persistência de NoV no meio ambiente, alta transmissibilidade e o problema da infecção crônica de indivíduos imunocomprometidos documentam a necessidade de tratamento antiviral e profilaxia de infecções por NoV (ETTAYEBY et al., 2016).

2.1.9 Vacinas

Com a falta de um antiviral específico para o tratamento de NoV, uma vacina seria a melhor opção para a sua efetiva prevenção, no entanto, fatores como a alta variabilidade dos vírus, a ausência de um modelo de cultivo para a replicação em grande escala e evidências de imunidade protetora de média a curta duração, dificultam a produção de uma vacina imunogênica e eficaz. Estudos vêm sendo constantemente realizados, entretanto, ainda não existe, até o momento, nenhuma vacina licenciada para uso (GREEN et al., 2013, DEBBINK et al., 2014).

Um dos estudos precursores neste tópico foi o desenvolvido por Guerrero et al. (2001), no qual foram utilizados camundongos BALB/c para avaliar a resposta imune sistêmica e de mucosas provocada após a inoculação oral e intranasal de partículas similares a vírus (*virus like particles* - VLPs) recombinantes de NoV. Os resultados deste estudo apontaram as VLPs como forte candidatas à gerar futuramente uma vacina contra o vírus. Pesquisas realizadas subsequentemente propuseram a utilização da partícula P de NoV que é altamente imunogênica, estável e produzida facilmente pela *E. coli*. Essa seria uma vacina quimérica, que poderia ser utilizada para NoV e RV simultaneamente (TAN et al., 2011). Outro estudo, sugere uma formulação de VLPs de NoV e proteína VP6 de RV, que poderia ser também uma ferramenta útil de imunização dupla para crianças. Os testes em camundongos demonstraram boa resposta imune, incluindo proteção cruzada para genótipos não contidos na formulação (BLAZEVIC et al., 2011).

Um dos estudos mais promissores no que diz respeito à imunização foi o conduzido por Ramirez et al. (2012), no qual foram utilizadas formulações à base de VLPs administradas por via intranasal em camundongos para demonstrar a resposta antígeno-específica e a produção de anticorpos do tipo IgA ou IgG. Os avanços estão surgindo e é provável logo em breve seja lançada a primeira vacina comercial contra NoV, apesar dos desafios. Estima-se que uma vacina com 50% de eficácia e uma proteção com duração de 12 meses contra a GA poderia economizar nos EUA cerca de US\$ 2,1 bilhões (BARTSCH et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Pesquisar a ocorrência de NoV em crianças com e sem diarreia residentes entre abril de 2010 e março de 2011 no semiárido da Região Nordeste do Brasil.

3.2 Objetivos Específicos

a) Detectar e genotipar as cepas circulantes de NoV no período estudado, tanto nos casos como nos controles.

b) Verificar casos de coinfeção de NoV com outros enteropatógenos;

c) Investigar associações dos genótipos encontrados com severidade dos sintomas do quadro diarreico (diarreia, vômitos, dor abdominal, náuseas);

d) Avaliar o impacto das infecções por NoV na saúde infantil (estado nutricional);

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Esse estudo constitui um dos objetivos do projeto de pesquisa intitulado Rede de Ovino Caprino Cultura e Diarreia Infantil no Semiárido Brasileiro (RECODISA) como parte do subprojeto - 1 denominado “Estudo da etiologia da diarreia infantil em crianças provenientes da comunidade urbana em Fortaleza, CE, Brasil, e do Semiárido Brasileiro”, que foi aprovado com recomendações pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – Reg nº. 12729 em 14 de julho de 2006 e recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMPEPE/UFC) em 22 de setembro de 2006, após atendimento das recomendações exigidas (**Anexos A e B**).

4.1.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi revisado e aprovado pelo COMPEPE/UFC, ofício nº. 338/09, protocolo COMPEPE nº. 238/05 em 20 de novembro de 2009 (**Anexo C**). O consentimento informado por escrito foi assinado pelos pais ou responsáveis das crianças durante a coleta de espécimes fecais.

4.1.2 Coleta

Após os procedimentos de triagem, assinatura do TCLE, entrevista, preenchimento da ficha epidemiológica e medidas antropométricas, os pais ou responsáveis receberam um copo de plástico, estéril, apropriado para a coleta de fezes e foram orientados sobre o procedimento de coleta. No dia seguinte, o membro da equipe retornou à residência da criança para o recebimento da amostra coletada. Caso a coleta não houvesse ocorrido, o grupo retornava à residência por até 5 dias úteis consecutivos, quando a criança então era excluída do estudo por falta de material.

A amostra coletada foi armazenada entre 2 - 8°C pelo prazo máximo de 4h, depois foi transportada ao centro de referência local e, posteriormente, enviada em

caixa térmica com gelo para o Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) da UPC/IBIMED da Faculdade de Medicina da UFC.

No máximo 6h após a coleta, os espécimes fecais foram aliquotados em dois tubos estéreis e armazenados abaixo de -80°C para posterior extração do RNA viral (**Figura 6**).

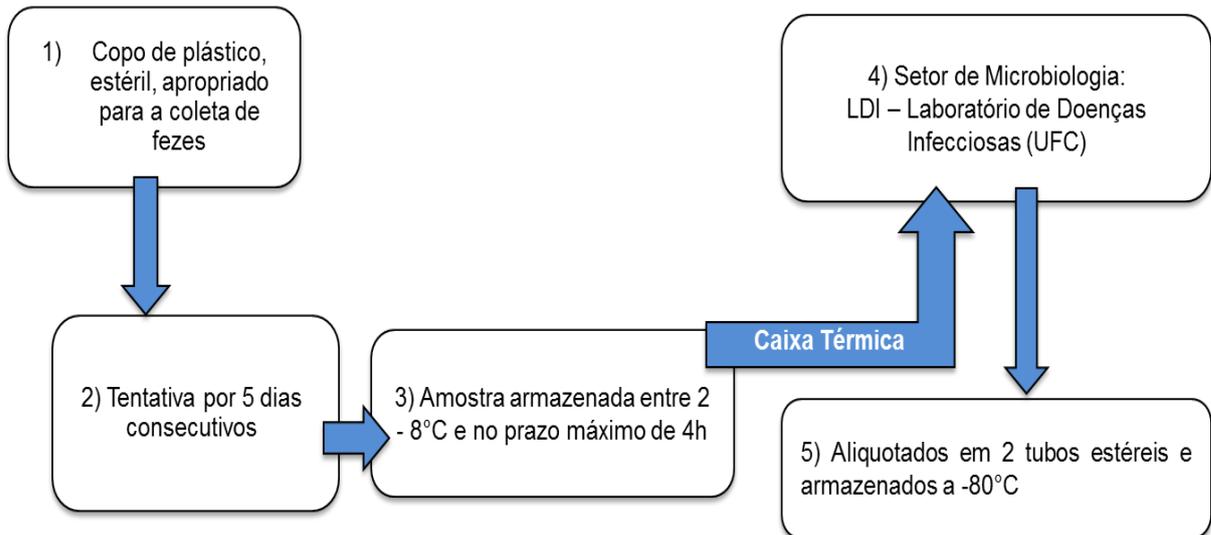


Figura 6 - Fluxograma de coleta das amostras nas seis cidades do semiárido brasileiro.

4.2 Desenho do estudo e definição de caso

O estudo caso/controle, epidemiológico foi conduzido em seis cidades da região nordeste do Brasil: Cajazeiras (Paraíba), Crato (Ceará), Ouricuri (Pernambuco), Patos (Paraíba), Picos (Piauí) e Sousa (Paraíba). Estas cidades foram designadas como representativas da região do semiárido do nordeste brasileiro, com população de mais de 50.000 habitantes cada (**Figura 7**). O Semiárido Brasileiro está localizado nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil e apresenta uma área territorial de 969.589,4 km² compreendendo 1.133 municípios de nove estados do Brasil: Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe.



Figura 7 – Região do semiárido brasileiro. Seis cidades do Nordeste, Brasil: Cajazeiras (Paraíba), Crato (Ceará), Ouricuri (Pernambuco), Patos (Paraíba), Picos (Piauí) e Sousa (Paraíba), marcadas em amarelo, além da capital do Ceará, Fortaleza. Fonte: Agência Nacional de Águas (ANA) / Ministério da Integração (MI).

Durante o período de abril 2010 a março de 2011 amostras foram coletadas de crianças com faixa etária entre 2-36 meses; em unidades de cuidados de saúde ou durante a vigilância ativa por profissionais de saúde. Uma entrevista foi realizada durante a inclusão no estudo, e informações detalhadas sobre saúde, tais como medidas antropométricas, estado de aleitamento materno, condições clínicas e ocorrência de diarreia foram coletadas através de um formulário de questionário padronizado (**Anexo D**).

Os casos de diarreia foram definidos como aqueles em que a criança apresentou episódios com três ou mais evacuações líquidas ou semilíquidas em um período de 24 horas, nos últimos 14 dias antes da coleta das fezes.

Um total de 200 crianças (100 casos e 100 controles) de cada cidade foram incluídas no estudo, totalizando 1200 participantes, 600 crianças com diarreia (casos) e 600 crianças sem diarreia (controles saudáveis), atendidos em unidades de saúde ou durante a vigilância ativa por profissionais de saúde nas residências. Desse total, foram selecionadas aleatoriamente cerca de 25 crianças por cidade (130 amostras). A estas, foram adicionadas 36 amostras positivas para NoV, testadas utilizando a

tecnologia Luminex Bio-Plex® System (Bio-Rad, EUA), conforme será melhor descrita posteriormente e também exemplificada na **Tabela 1**. Totalizando 166 amostras (117 casos e 49 controles).

Tabela 1 – Seleção dos participantes do estudo

Cidades do estudo	Amostras positivas		Amostras negativas		Total
	Nº de casos	Nº de controles	Nº de casos	Nº de controles	
Cajazeiras	7	1	14	3	25
Crato	2	0	10	13	25
Ouricuri	9	3	18	6	36
Patos	3	1	16	5	25
Picos	0	0	11	14	25
Sousa	9	1	18	2	30
Total	30	6	87	43	166

Casos= crianças com diarreia / Controle= crianças sem diarreia.

A seleção dos participantes do estudo foi baseada nos seguintes critérios de inclusão: crianças com idade variando entre 2 - 36 meses; crianças residentes em um dos locais de estudo; obtenção de consentimento escrito do pai ou responsável pela criança.

4.3 Processamento das amostras

4.3.1 Extração de ácido nucléico

Uma primeira pesquisa foi realizada utilizando o sistema Luminex Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, EUA). Microesferas de poliestireno acopladas a sondas de hibridização específicas para detectar diferentes painéis de agentes patogénicos foram utilizadas como se segue: vírus (rotavírus, norovírus, astrovírus e sapovírus) (LIU et al., 2011); bactérias (*Escherichia coli* patogénica, *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Aemonas* spp e *Vibrio* spp) (LIU et al., 2012; TANIUCHI et al., 2013); protozoários (*Giardia* spp, *Cryptosporidium* spp e *Entamoeba histolytica*) (TANIUCHI et al., 2011).

Os detalhes completos sobre amplificação de ácido nucleico, iniciadores e agentes patogênicos específicos de sequência estão descritos nas referências acima mencionadas.

O RNA viral, das crianças selecionadas para o estudo, foi purificado a partir de 140 µL de amostra da suspensão de fezes a 10% utilizando o kit de extração QIAamp Viral RNA™ (QIAGEN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e imediatamente armazenado a -70 °C.

4.3.2 Detecção de Norovírus

O ensaio quantitativo foi realizado em um sistema de PCR em Tempo Real ABI 7500 (Applied Biosystems, EUA) utilizando iniciadores e sondas previamente descritos (KAGEYAMA et al., 2003) e o sistema de RT-PCR Quantitativo em SuperScript III Platinum® (Invitrogen™, EUA). Resumidamente, o ensaio foi realizado utilizando 20 µL da mistura de reagentes e 5 µL de RNA das amostras purificadas com concentrações finais de iniciadores e sondas de 600 e 300 nM, respectivamente. As condições de ciclagem térmica foram realizadas como segue: um passo RT a 55°C por 30 min, um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 10 min, 35 ciclos de amplificação por PCR a 95 °C por 15 s e a 60 °C por 1 min. Utilizou-se uma diluição em série de 10 vezes de uma curva sintética contendo a junção ORF 1-2 para gerar curvas padrão para a quantificação de vírus (FUMIAN et al., 2016). Foram considerados 35 ciclos na reação e os sinais amostrados que cruzaram a linha limiar, apresentando uma curva sigmóide característica a partir do CT de número 36, foram considerados positivos.

4.3.3 Genotipagem de NoV

As amostras positivas para NoV foram genotipadas por sequenciamento da região ORF 1-2 ou da extremidade 3' parcial da região ORF1 por PCR (544 nt de comprimento) e nested-PCR (320 nt de comprimento), respectivamente. Os iniciadores (ou *primers*) 431/432 e G2SKR foram utilizados na primeira rodada e os iniciadores 431/432 e COG2R foram utilizados na reação seguinte, correspondendo à região C do genoma NoV (BEURET et al., 2002, KAGEYAMA et al., 2003) (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Iniciadores usados no PCR para amplificação do genoma do Norovírus.

Primers	Sequência (5'-3')^a	Orientação	Localização	Região	Posição
Mon431 ^c	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	+	RNA Pol ^b	B	5093– 5112 ^e
Mon432 ^d	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	+	RNA Pol	B	5093– 5112 ^e
G2SKR ^c	CCRCCNGCATRH CCRTTTRTACAT	-	VP1	C	5401- 5423 ^f
COG2R	TCGACGCCATCT TCATTCACA	-	RdRp/GII	C	5100

a Código IUPAC para indicar as posições: I, iosina; R, purina (A/G); Y, pirimidina (C/T); S, C/G; L, A/T/C/G; W, A/T; K, G/T; H, A/T/C. **b** Pol, Polimerase. **c** Genogrupo II. **d** Genogrupo I. **e** Posição do primer por Norwalk (M87661)-NoV GI. **f** Posição do primer por Lordsdale (X86557)-NoV GII.

Dos produtos da RT-PCR foram retirados 10 µL e adicionados a 2 µL do corante azul de bromofenol 10x *BlueJuice*TM (InvitrogenTM, EUA), estes foram posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X e impregnado com brometo de etídio a uma concentração final de 0,5 µg/mL, por aproximadamente 40 min a 120 Volts. Os *amplicons* foram visualizados com o auxílio do transluminador *DyNA Light Dual Intensity UV* (Labnet *National Company*, EUA). Os produtos amplificados pela PCR foram purificados através do kit QIAquick[®] PCR purification (QIAGEN[®], EUA) quando no caso de banda única apresentada no gel de agarose. Quando houve o caso do produto de PCR apresentar bandas inespecíficas, a banda de interesse foi excisada e purificada com o kit QIAquick Gel Extraction[®] (QIAGEN[®], EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.4 Análises de recombinações

As reações de sequenciamento foram realizadas na Plataforma Institucional FIOCRUZ (PDTIS), utilizando um kit de sequenciamento de ciclos ABI Prism BigDye[®] Terminator v3.1 e ABI Prism 3730 Genetic Analyzer[®] (ambos da Applied Biosystems, EUA). Posteriormente, foi feito o alinhamento das sequências consenso de cada amostra com a utilização do programa Clustal W (THOMPSON et al. 1997) juntamente com sequências protótipos de cada genótipo de NoV GII obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para edição do alinhamento utilizou-se o programa BioEdit (HALL et al., 1999). Inicialmente, os genótipos NoV foram atribuídos utilizando a ferramenta de genotipagem (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>),

e as cepas foram nomeadas de acordo com a nomenclatura proposta (KRONEMAN et al., 2013).

As árvores filogenéticas foram construídas usando o método de *neighbor-joining* (NJ) através do modelo Kimura-2-parametros integrado ao programa de pacote de dados MEGA (v.7.0.18) (KUMAR et al., 2016). A robustez de cada nó foi avaliada por análise de *bootstrap* utilizando 1.000 pseudo-réplicas. Para indicar a presença de possíveis cepas recombinantes, previamente detectadas pela ferramenta de genotipagem, e para identificar o ponto de recombinação, a análise da semelhança foi realizada utilizando SimPlot versão 3.5.1 (LOLE et al., 1999). As sequências nucleotídicas obtidas neste estudo foram depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), GenBank, sob o número de acesso de MF101875-MF10195.

4.4 Análise estatística

Uma análise bivariada foi inicialmente realizada. Os testes exatos de Qui-quadrado ou Fisher foram conduzidos para comparar variáveis categóricas entre grupos com presença ou ausência de diarreia, assim como, na presença ou não de infecção por NoV. Testes de Student t para dados com distribuição normal e testes de Mann Whitney para dados sem uma distribuição normal foram utilizados para comparar as variáveis contínuas entre esses grupos. O teste de normalidade utilizado foi o Kolmogorv-Smirnov.

A análise de classificação e regressão da árvore (CART) foi utilizada para investigar o impacto da combinação de coinfeções por diferentes patógenos com NoV, correlacionados com a definição de caso e posteriormente analisados pelo teste exato de Fisher. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Pacote Estatístico para Ciências Sociais (SPSS), versão 20 (IBM Corp, EUA). *P*-valores de $\leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Características da População

A coleta das amostras fecais foi realizada durante o período de abril de 2010 a março de 2011, e 166 crianças foram selecionadas para este estudo, que incluiu 117 casos de diarreia e 49 controles saudáveis. A **Tabela 3** mostra a caracterização da população estudada. A relação masculino-feminino foi de 52,4% - 47,6% e a média de idade das crianças foi de 16,2 e 17,1 meses no grupo de diarreia e controles saudáveis, respectivamente. A amamentação não-exclusiva foi relatada para a maioria das crianças (86,7%, 143/166). Quanto a renda, a maioria das famílias (79,5%, 132/166) relatou receber menos de dois salários mínimos mensalmente. Não foi observada diferença significativa quando se compararam as características da população entre casos de diarreia e controles saudáveis.

Tabela 3 – Caracterização entre crianças casos e controles do semiárido brasileiro.

Parâmetros	Total n= 166	Casos n= 117	Controles n= 49	*p valor
Sexo				
Masculino (%)	87 (52,4%)	61 (52,1%)	26 (53%)	1,00
Idade				
2 ≤ 12 m (%)	60 (36,1%)	41 (35%)	19 (38,7%)	0,723
> 12 ≤ 24 m (%)	68 (40,9%)	52 (44,4%)	16 (32,6%)	0,170
> 24 ≤ 36 m (%)	38 (23%)	24 (20,6%)	14 (28,7%)	0,311
Amamentação				
Exclusiva (%)	11 (6,6%)	9 (7,7%)	2 (4%)	0,506
Mista (%)	143 (86,1%)	98 (83,7%)	45 (92%)	0,221
Não mamou (%)	12 (7,2%)	10 (8,5%)	2 (4%)	0,512
Renda familiar mensal (em salários mínimos)				
≤ 2	132 (79,5%)	95 (81,2%)	37 (75,5%)	0,407
2 ≤ 5	32 (19,3%)	21 (18%)	11 (22,4%)	0,522
Não informou	2 (1,2%)	1 (0,8%)	1 (2,1%)	0,504

*P valor obtido por teste Mann-Whitney e Qui-quadrado (≤0,05 significante).

5.2 Características Clínicas da População e Estado Nutricional

A associação entre positivos para NoV e parâmetros clínicos mostrou que as crianças infectadas por NoV apresentaram escores z antropométricos diminuídos (WAZ, WHZ e BAZ) quando comparados às crianças não infectadas com significância estatística ($P < 0,05$). As análises dos sintomas de diarreia, tais como, duração, número de evacuações e presença de muco não diferiu entre as amostras positivas e negativas. Todos os outros sintomas clínicos não foram significativos, com exceção dos sintomas respiratórios (teste exato de Fisher, $P = 0,0096$, OR = 3,276, 95% [IC] = 1,33 a 8,048) (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Caracterização clínica das crianças do semiárido brasileiro.

Parâmetros	Total (n= 166)	NoV + (n= 75)	NoV – (n= 91)	*P valor
Medidas Antropométricas				
HAZ ¹ (média ± DP)	-0,632 ± 1,53	-0,636 ± 1,37	-0,629 ± 1,665	0,798
WAZ ² (média ± DP)	0,229 ± 1,198	0,015 ± 1,151	0,407 ± 1,214	0,034
WHZ ³ (média ± DP)	0,802 ± 1,459	0,511 ± 1,426	1,044 ± 1,449	0,033
BAZ ⁴ (média ± DP)	0,855 ± 1,535	0,546 ± 1,531	1,111 ± 1,498	0,033
Peso (kg; média ± DP)	10,45 ± 2,658	10,15 ± 2,566	10,68 ± 2,729	0,238
Diarreia				
Duração (dias; média ± DP)	4,36 ± 2,461	4,02 ± 1,838	4,67 ± 2,885	0,156
Nºevacuaç/dia (média ±DP)	4,53 ± 1,029	4,52 ± 1,005	4,54 ± 1,058	0,511
Muco nas fezes	10 (6%)	6 (8%)	4 (4,4%)	0,349
Sintomas				
Febre ($\geq 37,3$ °C) (%)	48 (28,9%)	22 (29,3%)	26 (28,5%)	1,00
Dor abdominal (%)	21 (12,6%)	9 (12%)	12 (13,1%)	1,00
Vômitos (%)	40 (24%)	17 (22,6%)	23 (25,2%)	0,719
Desidratação (%)	51 (30,7%)	18 (24%)	33 (36,2%)	0,094
Sintomas respiratórios (%)	26 (15,6%)	18 (24%)	8 (8,8%)	0,0096
Sinais comportamentais				
Inquietação (%)	46 (27,7%)	19 (25,3%)	27 (29,6%)	0,602
Fraqueza (%)	23 (13,8%)	12 (16%)	11 (12%)	0,504

¹z-scores Altura por Idade (HAZ), ²Peso por Idade (WAZ), ³Peso por Altura (WHZ) e ⁴ Índice de Massa Corporal (BAZ). Os valores em **negrito** possuem significância estatística após teste T student.

5.3 Detecção de Norovírus

No presente estudo, foi detectada uma presença de NoV de 45,2% (75/166) (Tabela 5). Entre as amostras, 32,5% (54/166) eram de casos de diarreia e 12,6% (21/166) eram de controles saudáveis ($P = 0,734$); e 33,7% (56/166) das crianças tinham menos de 2 anos de idade.

Tabela 5– Presença de Norovírus e seus genogrupos

		Caso	Controle	Total	P valor
Norovirus positivos	GI	5,5%(3/54)	4,7%(1/21)	2,4%(4/166)	1,0
	GII	94,4%(51/54)	95,2%(20/21)	42,7%(71/166)	0,86
	Total	46,1%(54/117)	42,8%(21/49)	45,2%(75/166)	0,73

* P valor obtido após teste exato de Fisher. Casos = crianças com diarreia / Controle = crianças sem diarreia. GI = genogrupo I / GII = genogrupo II

5.3.1 Quantificação do genoma viral

A quantificação do genoma de NoV por meio da RT-qPCR demonstrou valores que variaram de $1,16 \times 10^3$ a $1,73 \times 10^{11}$ cópias genômicas por grama de fezes nos casos e $1,84 \times 10^4$ a $8,65 \times 10^8$ nos controles. Observamos uma tendência para maior associação da carga viral nos casos de diarreia [$74,4 \times 10^8 \pm 2,8 \times 10^{10}$ cópias de genoma (gc) / g de fezes *versus* $1,62 \times 10^8 \pm 0,04 \times 10^{10}$ gc / g de fezes de casos e controles, respectivamente ($P > 0,05$)] (Figura 8).

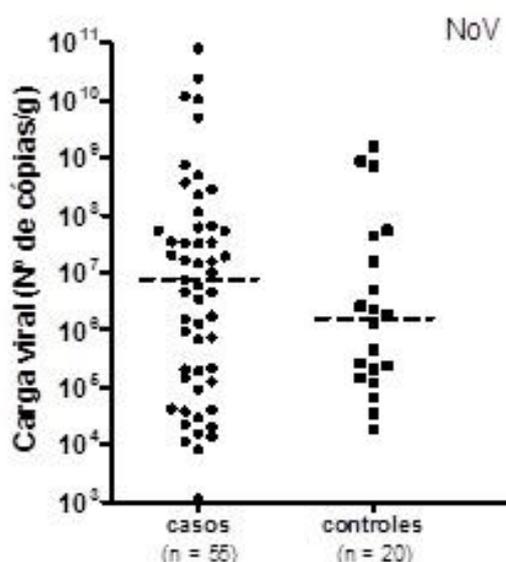


Figura 8 – Carga viral das amostras fecais. Não houve associação entre a carga viral e os grupos caso ou controle após teste de Mann Whitney ($P = 0,4357$). Casos= crianças com diarreia / Controle= crianças sem diarreia.

5.3.2 Distribuição entre as cidades

NoV GII foi detectado em 94,6% (71/75), enquanto GI foi detectado em apenas 5,3% (4/75) das amostras. A análise da detecção de NoV, entre as diferentes cidades analisadas, mostrou que Ouricuri apresentou a maior taxa de prevalência de NoV (37,3%, 28/75), seguida por Crato - CE (25,3%, 19/75), Cajazeiras - PE (16% 12/75), Souza - PB (13,3%, 10/75), Patos - PB (5,3%, 4/75) e Picos - PI (2,7%, 2/75), no entanto, não houve associação entre as cidades e a presença de NoV ($P > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição de Norovírus nas cidades do estudo

Local	Caso	Controle	Total	P valor
Ouricuri (PE)	77,7% (21/27)	77,7% (7/9)	77,7% (28/36)	1,0
Crato (CE)	75% (9/12)	76,9% (10/13)	76% (19/25)	1,0
Cajazeiras (PB)	47,6% (10/21)	50% (2/4)	48% (12/25)	1,0
Souza (PB)	33,3% (9/27)	33,3% (1/3)	33,3% (10/30)	1,0
Picos (PI)	18,1% (2/11)	0% (0/14)	8% (2/25)	0,1833
Patos (PB)	15,7% (3/19)	16,6% (1/6)	16% (4/25)	1,0
Total	46,1%(54/117)	42,8%(21/49)	45,2%(75/166)	0,73

Não houve associação significativa entre a presença de NoV e os grupos caso ou controle após teste exato de *Fisher* em nenhum dos locais do estudo. Casos = crianças com diarreia / Controle = crianças sem diarreia.

5.4 Sequenciamento e Análise Filogenética

Quanto à genotipagem, conseguimos sequenciar 25,3% (32/71) das cepas de NoV GII por PCR (região ORF1-2, n = 15) ou seminested-PCR (região 3' ORF1, n = 17) (**Figura 9A e B**). Considerando apenas a região do capsídeo, o genótipo mais predominante foi GII.3 (53,3%, 8/15), seguido por GII.14 (20%, 3/15). Por outro lado, quando consideramos a região da polimerase, os genótipos mais frequente encontrados foram GII.P7 (46,8%, 15/32) e GII.P16 (40,6%, 13/32). Nenhuma

detecção específica de genótipo foi estatisticamente associada a casos de diarreia ou controles saudáveis ($P > 0,05$).

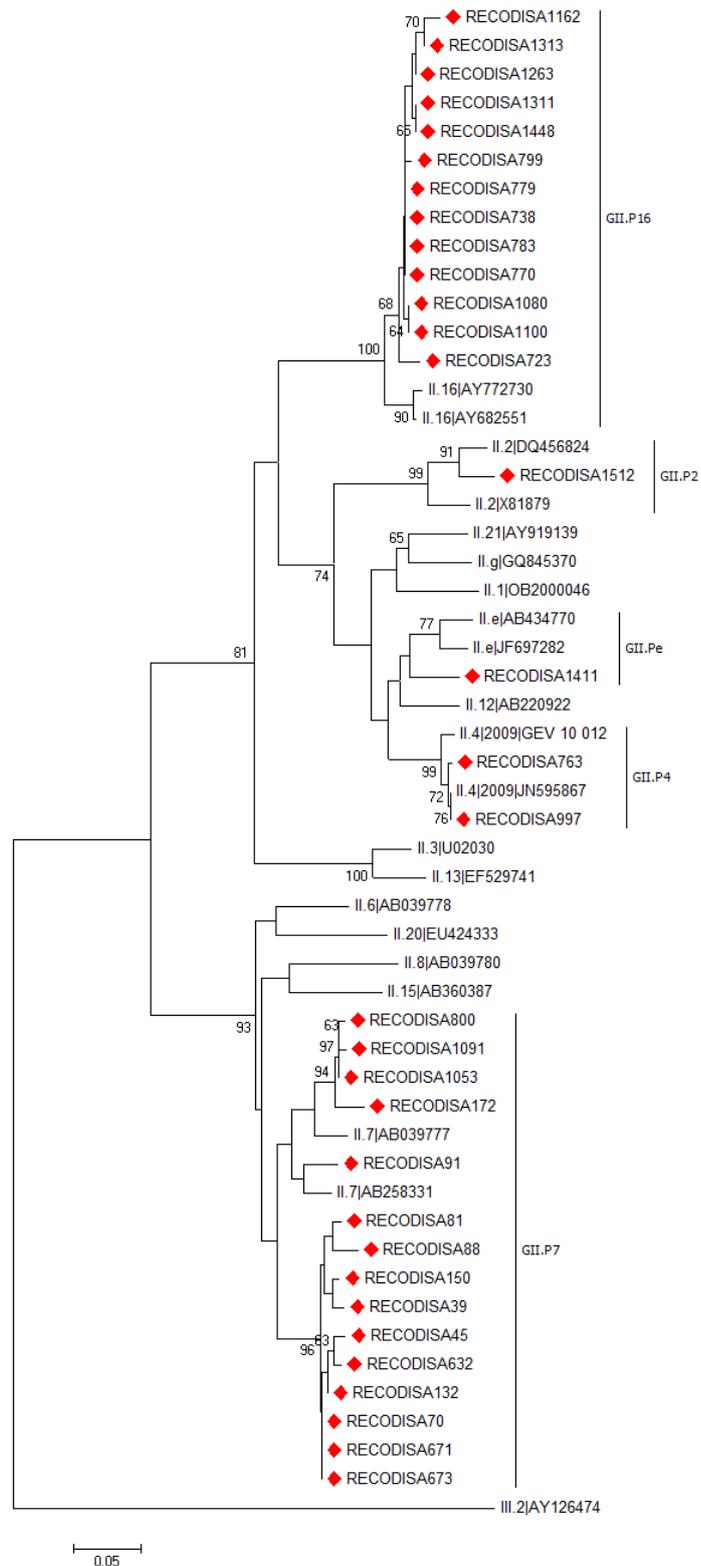


Figura 9 (A) - Árvore filogenética baseada na porção do gene da polimerase – ORF1 (n=32). As amostras do estudo foram marcadas com um diamante vermelho. *Bootstrap values* expressos em percentuais de 1000 réplicas e valores inferiores a 60% não foram mostrados.

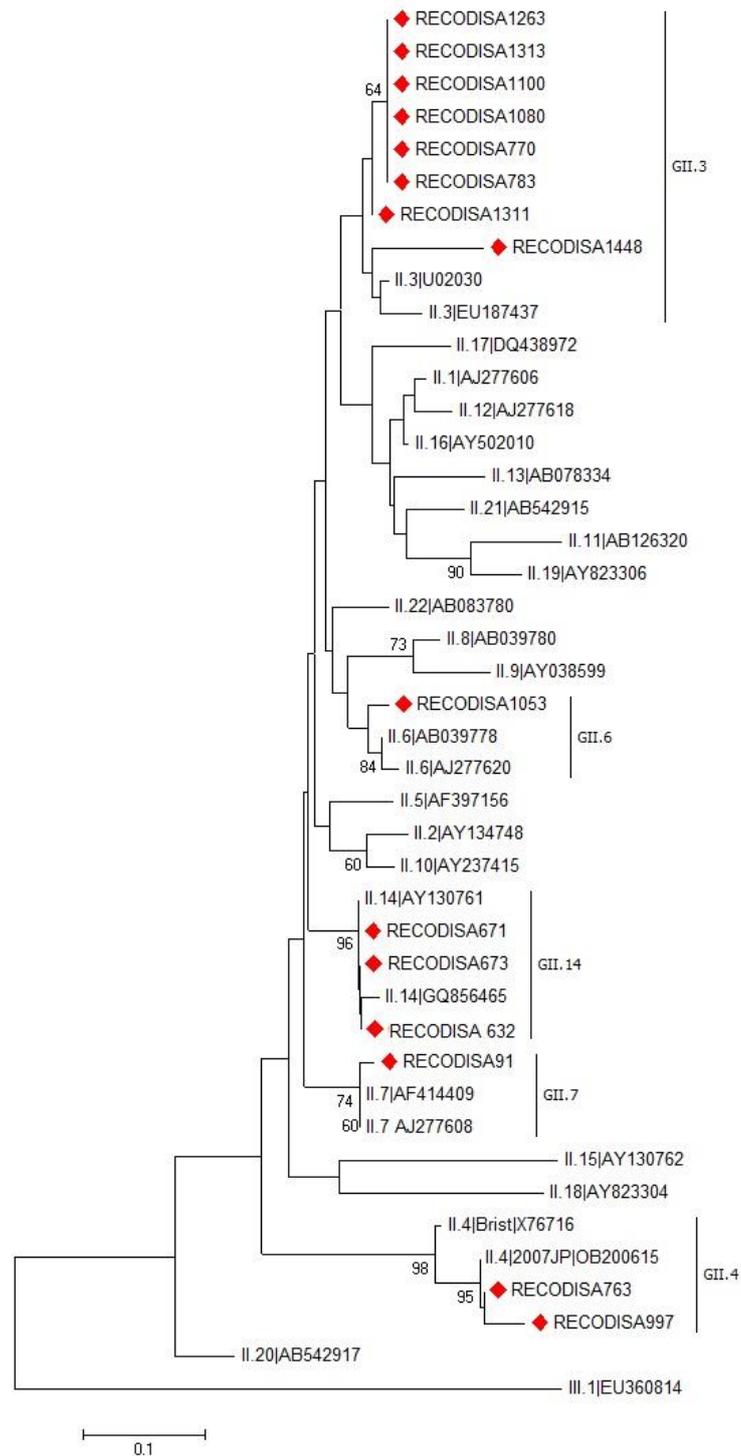


Figura 9 (B) - Árvore filogenética baseada na porção do gene do capsídeo – ORF2 (n=15). As amostras do estudo foram marcadas com um diamante vermelho. *Bootstrap values* expressos em percentuais de 1000 réplicas e valores inferiores a 60% não foram mostrados.

5.5 Análises de Recombinação

A análise de recombinação realizada revelou a ocorrência de recombinação na região de junção entre a polimerase e o capsídeo viral em 12 amostras, sendo

estas classificadas da seguinte forma: GII.P16/GII.3 (n=8), GII.P7/GII.14 (n=3) e GII.P7/GII.6 (n=1). Demonstramos também (**Figura 10 A e B**), o ponto de recombinação para dois dos três tipos de recombinantes detectadas (GII.P16-GII.3, GII.P7-GII.6), para ambas, o ponto de ruptura da recombinação foi localizado na junção das ORF (1 e 2).

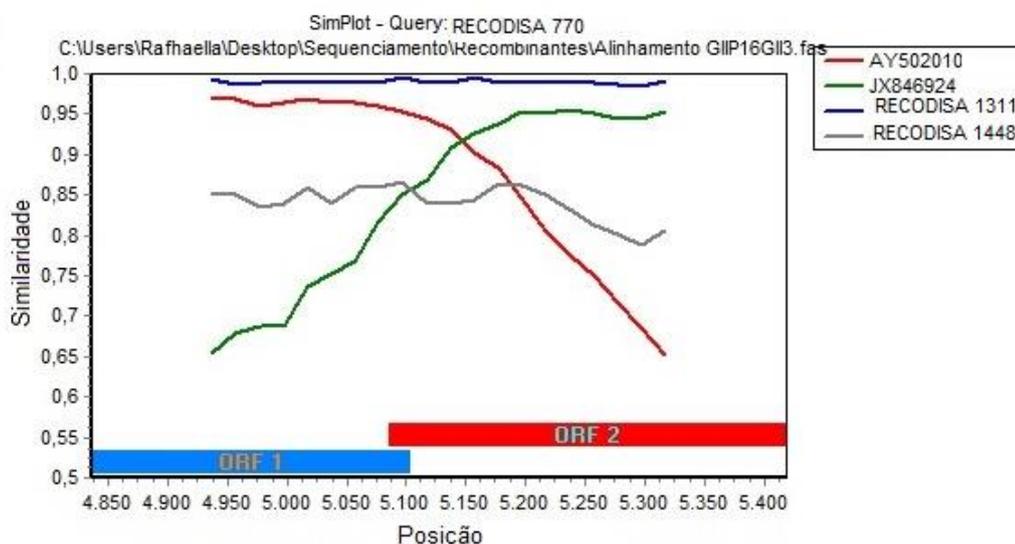


Figura 10 (A) – Análises de Simplot and Boostcan dos Norovirus recombinantes de amostras de GII.P16-GII.3. As amostras utilizadas na análise foram, as amostras do estudo, RECODISA 770 (Query); RECODISA 1311 (linha azul) e RECODISA 1448 (linha cinza), juntamente com as cepas referência AY502010 (linha vermelha) e JX846924 (linha verde). O eixo vertical indica identidades nucleotídicas (%) entre sequências de consulta (cepas semiáridas brasileiras) e cepas de referência.

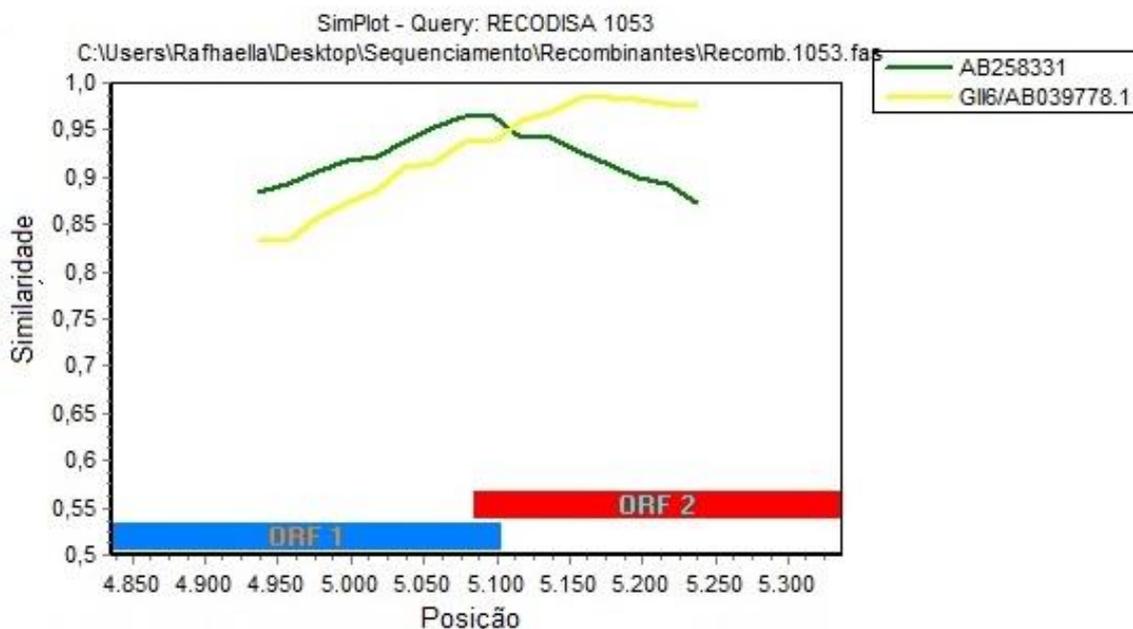


Figura 10 (B) – Análises de Simplot and Boostcan dos Norovirus recombinantes das amostras de GII.P7-GII.6. As amostras utilizadas na análise foram, a amostras do estudo RECODISA 1053 (Query) e as cepas referência AB258331 (linha verde); GI16/AB039778.1 (linha amarela). O eixo vertical indica identidades nucleotídicas (%) entre sequências de consulta (cepas semiáridas brasileiras) e cepas de referência.

5.6 Distribuição Temporal e Genótipos

Também foi investigado a distribuição temporal dos genótipos NoV ao longo do período de estudo (Abril de 2010 a Março de 2011) (**Figura 11**). Analisando a distribuição do número de casos positivos em relação ao número de amostras coletadas mensalmente, foi possível observar que a infecção por NoV ocorreu em quase todos os meses estudados, a exceção do mês de Janeiro de 2011. O maior pico de positividade ocorreu em Julho/2010. GII.P16-GII.3 foi detectado em ambos os anos, em quatro meses diferentes, a circulação das cepas GII.P7-GII.14 e GII.P7-GII.6 foi restrita ao ano de 2010, e GII.4 New Orleans_2009 circulou em Agosto e Novembro de 2010.

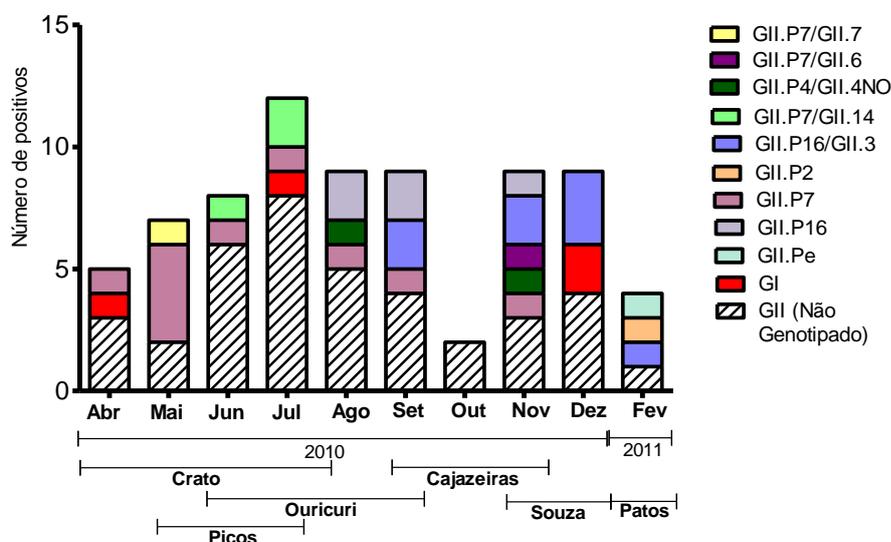


Figura 11 – Distribuição sazonal das amostras de NoV do estudo, no período de abril/2010 a fevereiro/2011, nas seis cidades da região do semiárido brasileiro avaliadas.

5.7 Colinfecções

Em relação às co-infecções, verificamos que 35,5% (59/166) das amostras do estudo foram co-infectadas por outros enteropatógenos. O patógeno mais prevalente detectado foi *E. coli* - EAEC enteroagregativa (44%, n = 33) seguido de *E. coli* - EPEC enteropatogênica (36%, n = 27), *Shigella* spp e *Salmonella* (ambos 20%, n = 15). A presença única de *Shigella* foi associada à positividade de NoV ($p = 0,0199$, OR = 3,0, intervalo de confiança 95% [IC] = 1,153 a 7,809), enquanto a detecção de EAEC foi associada à ausência de NoV ($P = 0,0050$, OR = 2,463, 95% [IC] = 1,313 a 4,622) (**Figura 12**).

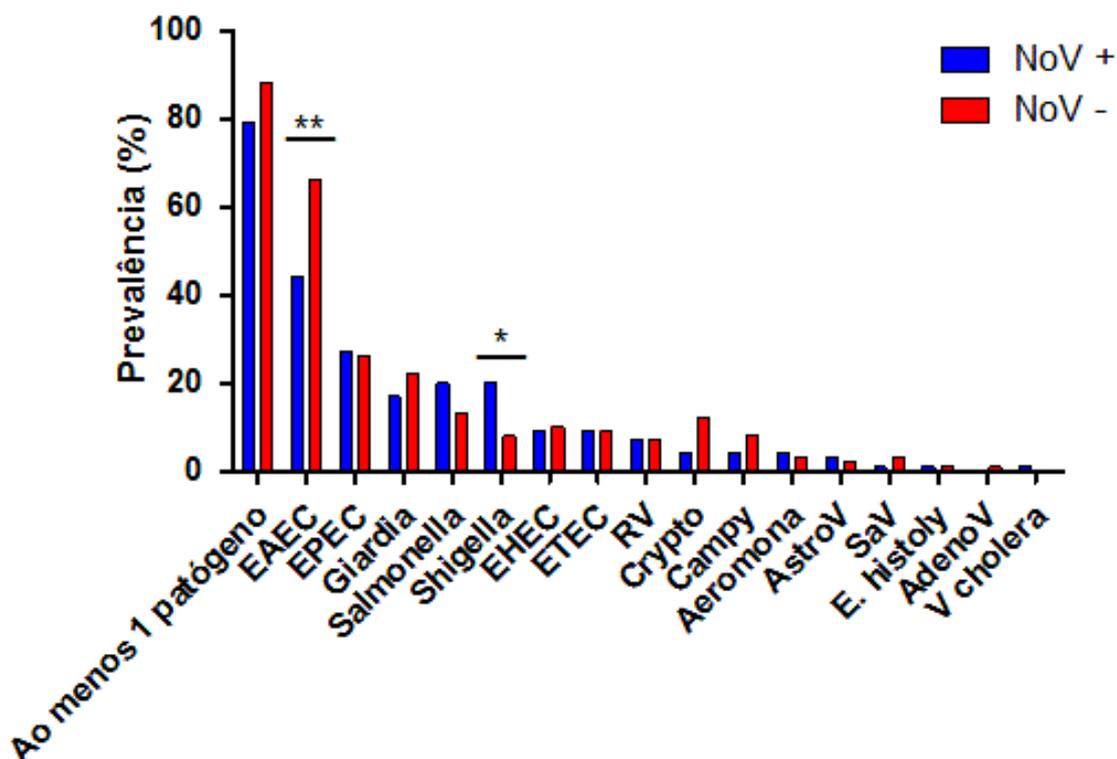


Figura 12 – Patógenos detectados na presença e ausência de Norovírus em amostras fecais, 0–36 meses. EAEC= enteroagregativa *Escherichia coli*; EPEC= enteropatogênica *E coli*; ETEC= enterotoxigênica *E coli*; EHEC= enterohemorrágica *E. coli*; RV= Rotavírus; Crypto= *Cryptosporidium*; Campy= *Campylobacter* spp.; AstroV= Astrovírus; SaV= Sapovírus; E. histolytica= *Entamoeba histolística*; AdenoV= Adenovírus; *V. cholera*= *Vibrio cólera*. Patógenos presentes em menos de 1% das amostras não foram mostrados. (**) P valor= 0,0050 OR = 2,463 [IC]= 1,313 a 4,622 (*) P valor= 0,0199 OR = 3,0 [IC]= 1,153 a 7,809. Teste exato de Fisher.

Também foram analisadas as coinfeções de NoV e outros enteropatógenos usando o *software* CART análise, para determinar a específica combinação de múltiplos patógenos associados com casos de diarreia ou controles saudáveis. A **Figura 13** apresenta a árvore de análise de classificação e regressão de amostras NoV-positivas distribuídas usando o binário de presença/ausência de outros enteropatógenos estudados. Houve associação significativa entre casos de diarreia e presença concomitante de EAEC e ausências de *Cryptosporidium* e EHEC / STEC (Terminal Node 2) (* P = 0,0167, OR = 4,8, 95% [IC] = 1,100 a 1,838).

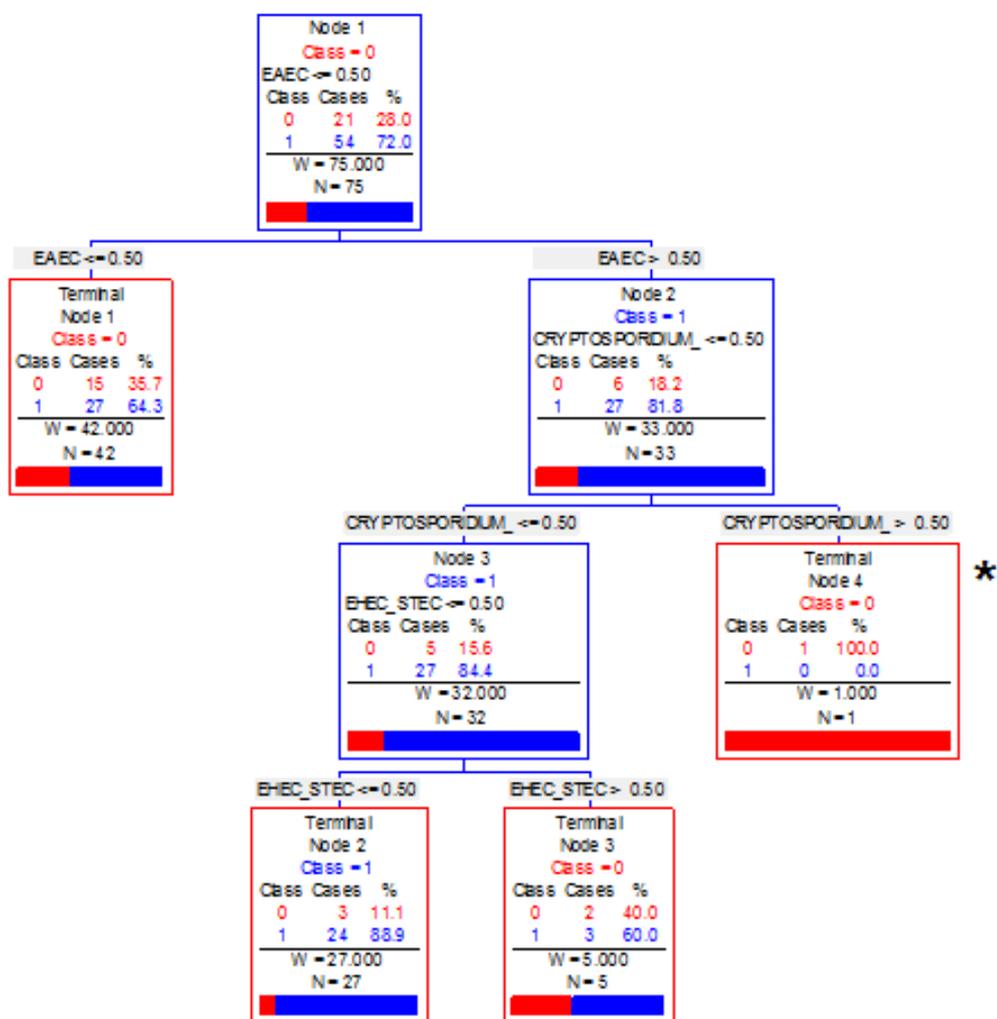


Figura 13 – Árvore de análise de classificação e regressão de coinfeções em amostras positivas de Norovírus (n=75). A presença ou ausência de cada patógeno entre grupos casos e controles está descrito dentro de cada nó. Nós terminais são indicados pela caixa vermelha. As árvores são hierárquicas por natureza. * $P \geq 0,05$. Associação significativa entre casos e a presença de *EAEC* e ausência de *Cryptosporidium* and *EHEC/STEC* (Terminal Node 2), * $P = 0,0167$, OR = 4,8 [IC] = 1,100 a 1,838.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos a presença de NoV e a sua epidemiologia em crianças com e sem diarreia de áreas do semiárido brasileiro. Em geral, o estudo destaca grande variabilidade genética de NoV no semiárido brasileiro e contribui para uma maior compreensão de sua epidemiologia, coinfeções por outros patógenos e a sua associação com a desnutrição infantil.

No grupo de crianças selecionadas para o estudo houve uma predominância das que apresentaram algum episódio diarréico, porém sem alteração da homogeneidade entre os grupos quanto aos parâmetros de caracterização da população avaliados (sexo, idade, taxa de amamentação e renda familiar mensal), não havendo diferenças estatísticas entre os casos e os controles. A renda mensal familiar inferior a 2 salários mínimos é condizente com estudos anteriores (AQUINO et al., 2011 e 2014) que demonstraram que os agricultores familiares com rendimentos anuais até R\$ 3 mil ainda constituem o segmento majoritário no interior do país, com a sua ampla maioria concentrada no Nordeste (65%).

Os efeitos da desnutrição associada com severa infecção por NoV - induzem perda de peso, diminuição da imunidade protetora resultado de reinfecções em série, redução de respostas de anticorpos antivirais e aumento da variabilidade viral - são bem relatados em estudos clínicos e em animais (BECK et al., 2004; HICKMAN et al., 2014). Estudos multicêntricos indicaram associação entre a desnutrição na primeira infância e a infecção por NoV (PLATTS-MILL et al, 2015; ROUHANI et al., 2016). No presente estudo, encontrou-se associações significativas de diagnóstico de NoV com menores medidas antropométricas de peso por idade (WAZ), peso por altura (WHZ) e índice de massa corporal por idade (BAZ), reforçando o papel de NoV na desnutrição. Entre a população estudada, observou-se uma baixa prevalência de aleitamento materno exclusivo (6,6%), o que corrobora a alta frequência de NoV em algumas cidades. Lima et al. (2000) demonstraram que a amamentação desempenha um papel fundamental na prevenção da diarreia e desnutrição.

Também exploramos sintomas extraintestinais entre crianças infectadas ou não com NoV. Nossos dados demonstraram que o único sintoma clínico associado à infecção por NoV foi a presença de sintomas respiratórios ou tosse. Estudo realizado na Austrália, Canadá e EUA, Hall et al. (2010) foi verificado em crianças menores de

5 anos, infectadas com NoV, porcentagem similar aos nossos dados sobre sintomas respiratórios concomitantes.

As taxas de detecção de NoV, neste estudo, variaram de 8 a 77,7% entre as cidades. Ouricuri (Pernambuco), que apresenta o menor índice de desenvolvimento humano entre os locais estudados (IPEA, 2013), apresentou a maior taxa de presença de NoV. Pesquisas anteriores revelaram altas taxas de prevalência de infecção por NoV (cerca de 35%) na região norte do Brasil, avaliando crianças internadas em hospitais com GA (FUMIAN et al., 2013; DA COSTA et al., 2017). Resultados semelhantes de taxas de prevalência de NoV foram observados em um estudo multicêntrico que demonstrou uma positividade média de NoV de 22,7% em amostras de fezes diarréicas, variando de 7,1 a 32,8% entre os locais (ROUHANI et al., 2016).

Além disso, encontramos maiores cargas virais de NoV em amostras diarréicas, porém sem associação. Corroborando com os nossos dados, outros estudos também encontraram uma tendência para maior detecção de carga viral em amostras de diarreia (BARREIRA et al., 2010; ROUHANI et al., 2016). O valor encontrado nesta pesquisa, tanto no grupo dos casos ($74,4 \times 10^8$ cópias de genoma (gc) / g de fezes), como no de controles ($1,62 \times 10^8$ cópias de genoma (gc) / g de fezes), foi maior ao observado em amostras provenientes de um país africano, no qual os pesquisadores também avaliaram pacientes sintomáticos e assintomáticos, onde o valor médio de carga viral para os pacientes com sintomas e infectados por cepas do genogrupo GII de NoV foi de $1,53 \times 10^5$ (HUYNEN et al., 2013).

Os carregadores assintomáticos de cepas de NoV foram anteriormente observados em crianças, embora ainda geralmente subestimado. Nosso estudo identificou uma frequência de NoV de 28% em crianças sem diarreia. As taxas de prevalência de infecção subclínica de NoV estão dentro de 17-30% em crianças no segundo ano de vida em países em desenvolvimento (FERREIRA et al., 2010; PLATTS-MILLS et al., 2015; ZAMBRUNI et al., 2016).

Em relação à caracterização genética de NoV, a baixa frequência de NoV GI no presente estudo corrobora com estudos prévios que também encontraram uma baixa prevalência desse genogrupo quando comparado ao GII (FIORETTI et al., 2011; ARVELO et al., 2012).

Neste estudo, a baixa taxa de detecção de GII.4 não era esperada, já que é bem conhecido que as cepas GII.4 ainda são os principais genótipos de NoV encontrados no Brasil e no mundo. No entanto, esse genótipo geralmente está

relacionado a doenças e surtos graves, sendo o genótipo prevalente e bem relatado em estudos envolvendo crianças hospitalizadas ou surtos de GA (MATHJIS et al., 2011; HOA TRAN et al., 2013; LESHEM et al., 2013). As únicas duas cepas GII.4 detectadas neste estudo foram coletadas em 2010, e foram classificadas como pertencentes à variante New Orleans_2009, que circulou no Brasil e no mundo após o ano de 2009 (VEGA et al., 2011; ANDRADE et al., 2014; FIORETTI et al., 2014; DA COSTA et al., 2017). Esta variante foi detectada pela primeira vez no inverno de 2009 - 2010, nos Estados Unidos, e contribuiu para o aumento do número de casos e surtos de GA no mundo (VEGA et al., 2011).

Uma grande proporção de cepas possivelmente recombinantes de NoV na região do semiárido brasileiro foi detectada pela primeira vez (80%, 12/15) neste estudo. A recombinação genética é um fenômeno muito comum na evolução de NoV, gerando mudanças importantes no seu genoma e aumentando a sua diversidade (WHITE et al., 2014), de modo que o surgimento de genótipos possivelmente recombinantes é amplamente relatado em todo o mundo (FUMIAN et al., 2012 e 2016; BRUGGINK et al., 2014 e 2016; HERNANDEZ et al., 2016; SUPADEJ et al., 2017). Neste estudo, a cepa recombinante mais prevalente detectada foi GII.P16-GII.3, tendo aparecido no final de 2010 e início de 2011. Este recombinante foi detectado pela primeira vez na Índia e na Itália no mesmo período (NAHAR et al., 2013; MEDICI et al., 2014). Em um estudo anterior que investigou cepas que circulam na região Nordeste do Brasil, entre os pacientes pediátricos que necessitaram de atendimento médico, o NoV GII.3 também foi relatado (SÁ et al., 2015). Também no Brasil, durante um estudo de vigilância realizado no sudeste do Brasil entre 2003-2004, GII.3 foi o segundo mais freqüentemente detectado (BARREIRA et al., 2010). Descoberta semelhante também foi relatada no sul da África entre 2009-2013 (MANS et al., 2014).

O genótipo GII.P7-GII.7, encontrado em apenas uma amostra controle do nosso estudo, tem circulado em diversas localidades do mundo há vários anos. Chaimongkol et al. (2014) encontraram o referido genótipo acometendo crianças hospitalizadas por GA na Tailândia. No Brasil, GII.P7/GII.7 foi identificado em estudos conduzidos em várias regiões do país (FIORETTI et al., 2011; ARAGÃO et al., 2013).

O genótipo da polimerase GII.P7 foi o genótipo mais freqüente detectado (46,8%) neste estudo e tem sido um genótipo de grande prevalência no Brasil desde sua primeira detecção no ano 2005 (FERREIRA et al., 2010; FIORETTI et al., 2011). Este genótipo também já foi descrito em um estudo realizado em uma comunidade

rural na região Norte do Brasil entre 2008-2010 (ARAGÃO et al., 2013). O genótipo da polimerase GII.P7 também foi detectado em duas formas recombinantes diferentes: GII.P7-GII.6 e GII.P7-GII.14. O primeiro foi detectado em vários países desde sua primeira descrição em 2011 em Burkina Faso, na África (MANS et al., 2014; FUMIAN et al., 2016; SUPADEJ et al., 2017) e a segunda cepa mais recombinante (GII.P7-GII.14) foi detectada em junho e julho de 2010, todas as amostras coletadas em Ouricuri. Em 2004, esta forma recombinante foi detectada a partir de um surto de GA no sul do Brasil (FUMIAN et al., 2016). Análises comparativas demonstraram que esta cepa, GII.P7-GII.14, eram muito semelhantes às encontradas na região Norte do país (99% de identidade) em estudo realizado em 2010 por Siqueira et al., (2013a).

Cada um dos genótipos, GII.Pe e GII.P2, foram detectados em apenas uma criança caso. GII.Pe foi detectado pela primeira vez na Austrália em 2008 (BRUGGINK et al., 2014) e, globalmente, foi observada sua associação com genótipos do capsídeo GII.2, GII.3, GII.4 e GII.12 (EDEN et al., 2010; MATHIJS et al., 2011; MEDICI et al., 2014). Posteriormente ao presente estudo, uma cepa com 97% de identidade com o genótipo GII.Pe, encontrado no nosso estudo, foi causa de um surto, associado a GII.4, no interior do Chile e no estado do Acre (DA SILVA, et al., 2013). Já quanto ao genótipo GII.P2, verificou-se que a mesma apresentou alta similaridade (96%) com amostra isolada em estudo ocorrido no mesmo período na Espanha, neste caso, ela esteve associada ao genótipo do capsídeo GII.2 (ARANA et al., 2014)

Na presente pesquisa, não foi possível definir um padrão de sazonalidade, tal como relatado anteriormente por Raboni et al. (2014) em investigação conduzida na região Sudeste do Brasil cujas estações do ano são melhores definidas do que na região Nordeste. Estudo realizado anteriormente em Fortaleza/CE observou panorama semelhante, no qual os NoV circularam regularmente ao longo de todos os meses pesquisados, com alguns picos (SÁ et al., 2015). Em outro estudo, realizado na região Norte, foram investigados fatores ambientais que poderiam influenciar nos picos de positividade, tais como precipitação pluviométrica, umidade e temperatura, entretanto não foi observada correlação entre eles e maiores taxas de detecção de NoV (SIQUEIRA et al., 2013a).

As interações de NoV com outros patógenos entéricos vêm sendo mais estudadas nos últimos anos. Em um estudo realizado no Brasil e em outros sete países de três continentes entre 2009 e 2010, o NoV foi detectado em 22,7% (1607/7077) de amostras fecais diarreicas de crianças, dos quais 77,7% foram

coinfectedos com outros enteropatógenos. Os mais comuns encontrados foram *Campylobacter*, *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) e Giardia. No entanto, não foram observadas diferenças nas taxas de infecção sintomática com ou sem esses agentes patogênicos associados (ROUHANI et al., 2016). Neste estudo, encontramos resultados semelhantes, uma vez que 78,6% das infecções por NoV apresentaram pelo menos um enteropatógeno associado detectado. Corroborando com Rouhani et al. (2016), o coinfectante mais prevalente foi a EAEC. Outro estudo realizado, a prevalência de co-infecções com EAEC foi associado com *deficit* no estado nutricional nos primeiros seis meses de vida em crianças de estudo multicêntrico coorte (LIMA et al., 2017), sugerindo uma correlação entre altas taxas de desnutrição e coinfecção com a EAEC, o que poderia ser explicado pelo baixo valor de renda da população estudada, e também condições sanitárias precárias e difícil acesso ao sistema de saúde.

Em estudo realizado na China, os autores descobriram que as interações de NoV com bactérias entéricas exigem a presença do antígeno do grupo *histoblood* (HBGA) - expressado por estas bactérias (LI et al., 2016). A HBGA foi identificada como um potencial receptor de NoV ou co-receptor, portanto, os glicanos transportados por diferentes bactérias entéricas desempenham um papel importante na infecção por vírus entéricos (TRANG et al., 2014, COULSON et al., 2015). Esta hipótese, pode explicar em parte a co-ocorrência ou ausência de bactérias específicas com vírus específicos, mas os motivos para esses mecanismos ainda precisam ser melhor estudados. Talvez essa seja a questão fundamental para explicar a relação entre presença / ausência de NoV e outros patógenos entéricos.

Outro ponto que pode justificar as altas taxas de coinfecção, principalmente por EAEC, encontradas, seriam pelas seguintes razões: existem dois comuns argumentos para que a EAEC seja encontrada em níveis elevados em indivíduos saudáveis, (i) baixos níveis de EAEC estão presentes em uma relação comensal assintomática no intestino humano e apenas aumenta para níveis detectáveis após a infecção com outro “verdadeiro” patógeno, porque a adesão entre a EAEC e o epitélio intestinal é mais forte do que para outros comensais; (ii) A imunidade pós-infecção é transportada para indivíduos aparentemente saudáveis; não havendo nenhuma associação clara entre distribuição de idade e carga de patógenos e/ou doença, como visto na infecção por NoV, em estudo anterior (PHILLIPS et al., 2009), sugerindo que

a imunidade adquirida contra a *EAEC* não protege contra a infecção e, portanto, não é provável que leve a carreadores assintomáticos (CHATTAWAY et al., 2013).

Nosso estudo teve algumas limitações. A coleta de amostras foi realizada durante diferentes linhas de tempo para cada cidade, de modo que a sazonalidade de NoV não pôde ser completamente avaliada. Mais dados sobre os perfis dietéticos que poderiam levar a uma melhor compreensão da influência nutricional sobre a infecção por NoV poderiam ter sido coletadas. Além disso, o pequeno tamanho da amostra obtida da população inicial impediu uma melhor avaliação de fatores-chave como sintomas clínicos e influências de coinfeção. Todavia, uma avaliação completa das 1200 amostras por RT-PCR mostraria uma prevalência de NoV mais precisa dos genótipos circulantes na população estudada.

Finalmente, este foi o primeiro estudo a avaliar a diversidade genética de NoV em um amplo estudo epidemiológico em crianças no semiárido brasileiro. Estes dados contribuem para uma melhor compreensão da epidemiologia de NoV e seu impacto na saúde, pois destaca grande variabilidade genética no semiárido brasileiro e acrescenta conhecimentos importantes sobre sua epidemiologia, coinfeções e o seu papel na desnutrição infantil.

7 CONCLUSÕES

✓ Verificou-se ampla diversidade genética nas amostras caracterizadas filogeneticamente, inclusive com ocorrência de cepas recombinantes;

✓ Nenhuma associação foi significativa entre os parâmetros socioeconômicos coletados das crianças e a presença/ausência da infecção por NoV;

✓ O único sintoma extraintestinal associado significativamente com a presença NoV foi o aparecimento de sintomas respiratórios ou tosse;

✓ Avaliando a região do capsídeo, o genótipo mais predominante foi GII.3, já se avaliarmos a região da polimerase, o genótipo mais frequente encontrado foi GII.P7. Ambos genótipos estiveram mais prevalente em casos de diarreia;

✓ O patógeno mais prevalente encontrado, tanto na presença como na ausência de NoV foi a *EAEC*, porém a sua associação só foi significativa na ausência de NoV. Na presença de NoV, o patógeno que apresentou uma associação significativa foi a *Shigella*;

✓ Para os casos positivos de NoV, a diarreia se mostrou associada à presença de *EAEC* e ausência simultânea de *Cryptosporidium* e *STEC*.

✓ Finalmente, o presente estudo forneceu dados acerca da epidemiologia de NoV no semiárido brasileiro, contribuindo para a vigilância epidemiológica no Brasil e no mundo e reforçando a importância da mesma, sobretudo no vislumbre de futura vacina contra este vírus; além disso, ressalta-se que este trabalho é pioneiro no Brasil na investigação da infecção por NoV em crianças da comunidade no semiárido brasileiro e nos aspectos clínicos relacionados a este quadro.

REFERÊNCIAS

- 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. **Ann. Intern.** (1973) August 25. <http://science.sciencemag.org/>.
- AHMED, S.M.; HALL, A.J.; ROBINSON, A.E.; VERHOEF, L.; PREMKUMAR, P.; PARASHAR, U.D.; et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis** (2014) 14(8):725-30.
- AMBERT-BALAY, K.; POTHIER, P. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples. **J Clin Virol** (2013), 56(3):194-8.
- ANDRADE, J.S.R.; ROCHA, M.S.; COSTA-CARVALHO, F.A.; FIORETTI, J.M.; XAVIER, M.P.T.P.; NUNES, Z.M.A.; et al. Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. **J of Clin Virol** (2014) 61 345-352.
- AQUINO, J.R. et al. Dimensão e localização do público potencial do PRONAF "B" no Brasil: uma análise a partir do Censo Agropecuário 2006. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 49, **Anais** (2011) Belo Horizonte/MG: SOBER.
- AQUINO, J.R. et al. Dimensão e características do público potencial do Grupo B do PRONAF na região Nordeste e no estado de Minas Gerais. In: SCHNEIDER, S., FERREIRA, B. e ALVES, F. (Orgs.). Aspectos multidimensionais da agricultura brasileira: diferentes visões do censo agropecuário 2006. Brasília/DF: **IPEA** (2014) p. 77-105 cap. 3.
- ARAGÃO, G.C.; MASCARENHAS, J.D.P.; KAIANO, J.H.L.; DE LUCENA, M.S.S.; SIQUEIRA, J.A.M.; et al. Norovirus diversity in diarrheic children from an African-descendant settlement in Belem, Northern Brazil. **Plos One** (2013) 8(2): e56608.
- ARANA, A.; CILLA, G.; MONTES, M.; GOMARIZ, M.; PÉREZ-TRALLERO, E. Genotypes, recombinant forms, and variants of norovirus GII.4 in Gipuzkoa (Basque Country, Spain), 2009-2012. **PLoS One** (2014) Jun 3;9(6):e98875.
- ARVELO, W.; SOSA, S.M.; JULIÃO, P.; LÓPEZ, M.R.; ESTEVÉZ, A.; LÓPEZ, B.; et al. Norovirus outbreak of probable waterborne transmission with high attack rate in a Guatemalan resort. **J Clin Virol** (2012) 55:8–11.
- ATMAR, R.L.; NEILL, F.H.; LE GUYADER, F.S.; Detection of human caliciviruses in fecal samples by RT-PCR. **Methods Mol. Biol** (2011) 665, 39–50.
- BARCLAY, L.; PARK, G. W.; VEGA, E.; HALL, A.; PARASHAR, U.; VINJÉ, J.; LOPMAN, B. Infection control for norovirus. **Clin Micr Infect** (2014) v.20 n.8 p.731-740.

BARREIRA, D.M.; FERREIRA, M.S.; FUMIAN, T.M.; CHECON, R.; DE SADOVSKY, A.D.; LEITE, J.P.; et al. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. **J Clin Virol** (2010) 47:60–4.

BARTELT, L.A.; LIMA, A.A.; KOSEK, M.; PEÑATARO, Y.P.; LEE, G.; GUERRANT, R.L. “Barriers” to child development and human potential: the case for including the “Neglected Enteric Protozoa” (NEP) and other enteropathy-associated pathogens in the NTDs. **PLoS Neglected Tropical Diseases** (2013) v. 7, n. 4.

BARTSCH, S.M.; LOPMAN, B.A.; HALL, A.J.; PARASHAR, U.D.; LEE, B.Y. The potential economic value of a human norovirus vaccine for the United States. **Vaccine** (2012) 30 (49), 7097 – 7104.

BECK, M.A.; HANDY, J.; LEVANDER, O.A. Host nutritional status: the neglected virulence factor. **Trends Microbiol** (2004) 12:417– 423.

BERTOLOTI-CIARLET, A.; WHITE, L.J.; CHEN, R.; PRASAD, B.V.; ESTES MK. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. **J. Virol** (2002) 76:4044 –4055.

BERTOLOTI-CIARLET, A.; CRAWFORD, S.E.; HUTSON, A.M.; ESTES, M.K. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. **J Virol** (2003) 77:11603–11615.

BEURET, C.; KOHLER, D.; BAUMGARTNER, A.; LÜTHI, T.M. Norwalk-like viruses sequences in mineral waters: one year monitoring of three brands. **Appl Environ Microbiol** (2002) 68: 1925–31.

BHUTTA, Z.A.; SOMMERFELD, J.; LASSI, Z.S.; SALAM, R.A.; DAS, J.K. Global burden, distribution, and interventions for infectious diseases of poverty. **Infect Dis Poverty** (2014) v. 3, n. 21.

BLAZEVIC, V.; LAPPALAINEN, S.; NURMINEN, K.; HUHTI, L.; VESIKARI, T. Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis. **Vaccine** (2011) 19;29(45):8126-33.

BON, F.; AMBERT-BALAY, K.; GIRAUDON, H.; KAPLON, J.; LE GUYADER, S.; POMMEPUY, M.; et al. Molecular epidemiology of caliciviruses detected 76 in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. **J. Clin. Microbiol** (2005) v. 43, n. 9, p. 4659-4664.

BRUGGINK, L.D.; DUNBAR, N.L.; MARSHALL, J.A. Emergence of GII.e as a major ORF 1 norovirus genotype and its associated ORF 2 GII.4 variant forms. **Infection, Genetics and Evolution** (2014) 22, 157–163.

BRUGGINK, L.D.; MOSELEN, J.M.; MARSHALL, J.A. The comparative molecular epidemiology of GII.P7_GII.6 and GII.P7_GII.7 norovirus outbreaks in Victoria, Australia, 2012-2014. **Intervirology** (2016) 59(1):60-5.

BUCARDO, F.; REYES, Y.; SVENSSON, L.; NORDGREN, J. Predominance of norovirus and sapovirus in Nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination. **PLoS One** (2014) 21;9(5):e98201.

BULL, R.A.; TU, E.T.; MCIVER, C.J.; RAWLINSON, W.D.; WHITE, P.A. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. **J. Clin. Microbiol** (2006) 44:327–333.

BULL, R.A.; TANAKA, M.M.; WHITE, P.A. Norovirus recombination. **J Gen Virol** (2007) 88:3347–59.

CDC (*CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION*). Norovirus treatment. EUA: **CDC** (2012). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/norovirus/about/treatment.html>>. Acesso em: 20 maio de 2017.

CHADWICK, P.R.; MCCANN, R. Transmission of a small round structured virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis. **J Hosp Infect** (1994) 26: 251-259.

CHAIMONGKOL, N.; KHAMRIN, P.; MALASAO, R.; THONGPRACHUM, A.; KONGSRICHAROERN, T.; UKARAPOL, N.; et al. Molecular characterization of norovirus variants and genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in Thailand. **J Med Virol**. (2014) v.86, n. 7, p.1210-8.

CHATTAWAY, M.A.; HARRIS, R.; JENKINS, C.; TAM, C.; COIA, J.E.; GRAY, J.; et al. Investigating the link between the presence of enteroaggregative *Escherichia coli* and infectious intestinal disease in the United Kingdom, 1993 to 1996 and 2008 to 2009. **Euro Surveill** (2013) 18(37):pii=20582.

CHEETHAM, S.; SOUZA, M.; MEULIA, T.; GRIMES, S.; HAN, M.G.; SAIF, L.J. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. **J. Virol**. (2006) 80, 10372–10381.

COULSON BS. Expanding diversity of glycan receptor usage by rotaviruses. **Curr Opin Virol** (2015) 15:90–6.

DA COSTA, S.T.P.; FUMIAN, T.M.; DE LIMA, I.C.G.; SIQUEIRA, J.A.M.; DA SILVA, L.D.; HERNÁNDEZ, J.M.; et al. High prevalence of norovirus in children with sporadic acute gastroenteritis in Manaus, Amazon Region, northern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** (2017) Rio de Janeiro: 1-5.

DA SILVA, L.D.; RODRIGUES, E.L.; DE LUCENA, M.S.S.; et al. Detection of the pandemic norovirus variant GII.4 Sydney 2012 in Rio Branco, state of Acre, northern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** (2013) Rio de Janeiro, Vol. 108(8): 1068-1070, December.

DE GRAAF, M.; VAN BEEK, J.; KOOPMANS, M.P. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. **Nat Rev Microbiol**. (2016) Jul;14(7):421-33.

DEBBINK, K.; LINDESMITH, L.C.; BARIC, R.B. The State of Norovirus Vaccines. **CID** (2014) 58(12): 1746-1752.

DONALDSON, E.F.; LINDESMITH, L.C.; LOBUE, A.D.; BARIC, R.S. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. **Nat. Rev. Microbiol.** (2010) 8:231–241.

DUIZER, E.; BIJKERK, P.; ROCKX, B.; GROOT, A.; TWISK, F.; KOOPMANS, M. Inactivation of Caliciviruses. **Appl Environ Microbiol** (2004) 70: 4538-4543.

EDEN, J.S.; BULL, R.A.; TU, E.; MCIVER, C.J.; LYON, M.J.; MARSHALL, J.A.; et al. Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008. **J. Clin. Virol.** (2010) 49:265–271.

ETTAYEBI, K.; et al. Replication of human noroviruses in stem cell–derived human enteroids. **Science** (2016). doi:10.1126/science.aaf5211.

FERREIRA, M.S.; VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F.A.; VIEIRA, C.B.; XAVIER, M.P.; FIORETTI, J.M.; et al. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005–2008. **J. Med. Virol** (2010) 82, 1442–1448.

FERREIRA, M.S.; CUBEL GARCIA, R.C.; XAVIER, M.D.A. P; RIBEIRO, R.L.; ASSIS, R.M.; MOTA, M.D.O.C.; et al. Genotyping of gastroenteric viruses in hospitalised children: first report of norovirus GII.21 in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** (2012) v. 107, n. 8, p. 1064-1067.

FIORETTI, J.M.; FERREIRA, M.S.; VICTORIA, M., VIEIRA, C.B.; XAVIER, M.P.; LEITE, P.; MIAGOSTOVICH, J.P.; Genetic diversity of noroviruses in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** (2011) 106:942–947.

FIORETTI, J.M.; BELLO, G.; ROCHA, M.S.; VICTORIA, M.; LEITE, J.P.; MIAGOSTOVICH, M.P. Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. **PLoS One** (2014) 25:e92988.

FUMIAN, T.M.; ARAGÃO, G.C.; MASCARENHAS, J.D.; KAIANO, J.H.; SIQUEIRA, J.A.; SOARES, L.S.; et al. Detection of a novel recombinant strain of norovirus in an African-descendant community from the Amazon region of Brazil in 2008. **Arch Virol** (2012) 157(12):2389-92.

FUMIAN, T.M.; JUSTINO, M.C.A.; MASCARENHAS, J.D.P.; REYMÃO, T.K.A.; ABREU, E.; SOARES, L.; et al. Quantitative and molecular analysis of noroviruses RNA in blood from children hospitalized for acute gastroenteritis in Belém, Brazil. **J. Clin. Virol.** (2013) v. 1, n. 58, p. 31-35.

FUMIAN, T.M.; DA SILVA RIBEIRO DE ANDRADE, J.; LEITE, J.P.; MIAGOSTOVICH, M.P. Norovirus Recombinant Strains Isolated from Gastroenteritis Outbreaks in Southern Brazil, 2004-2011. **PLoS One** (2016) 26;11(4):e0145391.

GALE, A.R.; WILSON, M. Diarrhea: Initial Evaluation and Treatment in the Emergency Department. **Emerg Med Clin North Am.** (2016) v. 34, n. 2, p.293-308.

GLASS, R.J.; WHITE, L.J.; BALL, J.M.; LEPARE-GOFFART, I.; HARDY, M.E.; ESTES, M.K. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. **J Virol** (2000) 74: 6581-6591.

GLASS, R.I.; PARASHAR, U.D.; ESTES, M.K. Norovirus Gastroenteritis. **N Engl J Med** (2009) 361:1776–85.

GREEN, K.Y.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, A.Z.; Human caliciviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E.; editors. **Fields Virology** (2007) 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 949– 980.

GREEN, K.Y.; et al. Caliciviridae: The Noroviruses, in: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; COHEN, J.L.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; RACANIELLO, V.R.; ROIZMAN (Eds.). **Fields Virology** (2013) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 582–608.

GUERRANT, R.L.; VAN GILDER, T.; STEINER, T.S.; et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhoea. **Clin Infect Dis**. (2001) v. 32, p. 331–350.

GUERRANT, R.L.; DEBOER, M.D.; MOORE, S.R.; SCHARF, R.J.; LIMA, A.A. The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. (2013) v. 10, n. 4, p. 220–229.

GUERRERO, R.A.; BALL, J.M.; KRATER, S.S.; PACHECO, S.E.; CLEMENTS, J.D.; ESTES, M.K. Recombinant Norwalk virus-like particles administered intranasally to mice induce systemic and mucosal (fecal and vaginal) immune responses. **J Virol**. (2001) 75(20):9713-22.

HALL, A.J.; VINJÉ, J.; LOPMAN, B.; PARK, G.W.; YEN, C.; GREGORICUS, N.; et al. Centers of Disease Control and Prevention MMWR **Morb Mortal Wkly** (2011) Rep;60:1-16.

HALL, A.J. Noroviruses: the perfect human pathogens? **J Infect Dis**. (2012) 205(11):1622-4,.

HALL, G.; MCDONALD, L.; MAJOWICZ, S.E.; SCALLAN, E.; KIRK, M.; et al. Respiratory symptoms and the case definition of gastroenteritis: an international analysis of the potential impact on burden estimates. **Epidemiol Infect** (2010) 138, 117–124.

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

HARRIS, J.P.; EDMUNDS, W.J.; PEBODY, R.; BROWN, D.W.; LOPMAN, B.A.; Deaths from norovirus among the elderly, England and Wales. **Emerg Infect Dis** (2008) 14:1546-1552.

HERNANDEZ, J.D.; DA SILVA, L.D.; SOUSA JUNIOR, E.C.; DE LUCENA, M.S.; SOARES, L.D.A.S.; MASCARENHAS, J.D.; GABBAY, Y.B. Analysis of uncommon norovirus recombinants from Manaus, Amazon region, Brazil: GII.P22/GII.5, GII.P7/GII.6 and GII.Pg/GII.1. **Infect Genét. Evol.** (2016) n. 39, p. 365-71.

HICKMAN, D.; JONES, M.K.; ZHU, S.; KIRKPATRICK, E.; OSTROV, D.A.; WANG, X.; et al. The effect of malnutrition on norovirus infection. **MBio** (2014) Mar 4; 5(2):e01032-13.

HOA TRAN, T.N.; TRAINOR, E.; NAKAGOMI, T.; CUNLIFFE, N.A.; NAKAGOMI, O. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. **J Clin Virol.** (2013) 56(3):185-93.

HODGES, K.; GILL, R. Infectious diarrhoea: Cellular and molecular mechanisms. **Gut Microbes** (2010) 1(1):4-21.

HUYNEN, P.; MAUROY, A.; MARTIN, C.; SAVADOGO, L.G.; BOREUX, R.; THIRY, E.; MELIN, P.; DE MOL, P. Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. **J. Clin. Virol.** (2013) v. 58, n. 3, p. 515-521.

ICTV. Virus Taxonomy: 2016 Release. **ICTV** (2016). Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/>>. Acesso em: 21 de maio de 2017.

IPEA (Instituto de Pesquisa e Economia Aplicada). **IPEA** (2013). Disponível em: <<http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/consulta/>>. Acesso em: 12 de março de 2017.

JIANG, X.; GRAHAM, D.Y.; WANG, K.N.; ESTES, M.K. Norwalk virus genome cloning and characterization. **Science** (1990) n.250, p. 1580-1583.

JIANG, X.; WANG, M.; WANG, K.; ESTES, M.K. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. **Virology** (1993) 195(1):51-61.

KAGEYAMA, T.; KOJIMA, S.; SHINOHARA, M.; et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription PCR. **J. Clin. Microbiol.** (2003) 41(4), 1548–1557.

KANKANAMALAGE, A.C.G.; KIM, Y.; WEERAWAMA, P.M.; UY, A.Z.; DAMALANKA, V.C.; MANDADAPU, S.R.; et al. Structure-guided design and optimization of dipeptidyl inhibitors of norovirus 3CL protease. Structure-activity relationships and biochemical, X-ray Crystallographic, Cell-Based, and In vivo studies. **J Med Chem** (2015) 58: 3144-3155.

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. **J Virol.** (1972) 10:1075–81.

KATO, K.; ISHIWA, A. The role of carbohydrates in infection strategies of enteric pathogens. **Trop Med Health** (2015) 43(1):41-52.

KIM, Y.; THAPA, M.; HUA, D.H.; CHANG, K.O. Biodegradable nanogels for oral delivery of interferon for norovirus infection. **Antiviral Res** (2011) 89:165–173.

KINGSLEY, D.H.; VINCENT, E.M.; MEADE, G.K.; WATSON, C.L.; FAN, X. Inactivation of human norovirus using chemical sanitizers. **Int J Food Microbiol** (2014) 171: 94-99.

KOOPMANS, M.; DUIZER, E. Foodborne viruses: an emerging problem. **Int J Food Microbiol** (2004) 90: 23-41.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R.L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ** (2003) v. 81, n. 3, p. 197-204.

KRONEMAN, A.; VEGA, E.; VENNEMA, H.; VINJÉ, J.; WHITE, P.A.; HANSMAN, G.; et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. **Arch Virol.** (2013) 158(10):2059-68.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol.** (2016) Jul;33(7):1870-4.

LANATA, C.F.; FISCHER-WALKER, C.L.; OLASCOAGA, A.C.; TORRES, C.X.; ARYEE, M.J.; BLACK, R.E.; CHILD HEALTH EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP OF THE WHO AND UNICEF. Global causes of diarrhoeal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. **PLoS One** (2013) Sep 4;8(9):e72788.

LEE, K.S.; KANG, D.S.; YU, J.; CHANG, Y.P.; PARK, W.S. How to do in persistent diarrhea of children?: concepts and treatments of chronic diarrhea. **Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.** (2012) Dec; 15(4):229-36.

LEE, N.; CHAN, M.C.; WONG, B.; CHOR, K.W.; SIN, W.; CHOI, K.W.; et al. Fecal viral concentration and diarrhea in norovirus gastroenteritis. **Emerg Infect Dis** (2007) 13:1399-401.

LESHEM, E.; WIKSWO, M.; BARCLAY, L.; BRANDT, E.; STORM, W.; SALEHI, E.; et al. Effects and clinical significance of GII.4 Sydney norovirus, United States, 2012-2013. **Emerg Infect Dis.** (2013) v. 19, n. 8, p. 1231-8.

LI, L.L.; LIU, N.; HUMPHRIES, E.M.; YU, J.M.; LI, S.; LINDSAY, B.R.; STINE, O.C.; DUAN, Z.J. Aetiology of diarrhoeal disease and evaluation of viral-bacterial coinfection in children under 5 years old in China: a matched case-control study. **Clin Microbiol Infect.** (2016) Apr; 22(4):381.e9-381.e16.

LI, J.; PREDMORE, A.; DIVERS, E.; LOU, F. New Interventions against human norovirus: progress, opportunities, and challenges. **Annu Rev Food Sci Technol** (2012) 3: 331-352.

LIMA, A.A.; FANG, G.; SCHORLING, J.B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J.F.; MOTA, S.; et al. Persistent diarrhoea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr. Suppl.** (1992) v. 381, p. 39-44.

LIMA, A.A.M.; MOORE, S.R.; BARBOZA JR, M.S.; SOARES, A.M.; SCHLEUPNER, M.A.; NEWMAN, R.D.; et al. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J Infect Dis.** (2000) May;181(5):1643-51.

LIMA, A.A.M.; LEITE, A.M.; DI MOURA, A.; LIMA, N.L.; SOARES, A.M.; ABREU, C.B.; et al. Determinant Variables, Enteric Pathogen Burden, Gut Function, and Immune-Related Inflammatory Biomarkers Associated with Childhood Malnutrition: A Prospective Case-Control Study in Northeastern Brazil. **Ped Infect Dis** (2017) Feb 22.

LIU, J. et al. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. **J of Clin Virology** (2011) 50 308–313.

LIU, J.; GRATZ, J.; MARO, A.; KUMBURU, H.; KIBIKI, G.; TANIUCHI, M.; et al. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. **J Clin Microbiol.** (2012) 50 (1):98-10.

LOLE, K.S.; BOLLINGER, R.C.; PARANJAPE, R.S.; GADKARI, D.; KULKARNI, S.S.; NOVAK, N.G.; et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. **J. Virol.** (1999) v. 73, n. 1, p.152-160.

LOPMAN, B.; VENNEMA, H.; KOHLI, E.; POTHIER, P.; SANCHEZ, A.; NEGREDO, A.; et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. **Lancet** (2004) 363:682–688.

LOPMAN, B. Air sickness: vomiting and environmental transmission of norovirus on aircraft. **Clin Infect Dis** (2011) 53: 521-522.

LOPMAN, B.; et al. Global burden of norovirus and prospects for vaccine development. *Centers for Disease Control and Prevention* **CDC** (2015).

LORNTZ, B.; SOARES, A.M.; MOORE, S.R.; PINKERTON, R.; GANSNEDER, B.; BOVBJERG, V.E.; et al. Early childhood diarrhea predicts impaired school performance. **Pediatr Infect Dis J.** (2006) Jun;25(6):513-20.

MACHADO, M.M.; LINDSAY, A.C.; MOTA, G.M.; ARRUDA, C.A.; AMARAL, J.J.; FORSBERG, B.C. A community perspective on changes in health related to diarrhoea in northeastern Brazil. **Food Nutr Bull.** (2011) v. 32, n. 2, p. 103-11.

MANS, J.; MURRAY, T.Y.; TAYLOR, M.B. Novel norovirus recombinants detected in South Africa. **Virol J** (2014) 11:168.

MARKS, P.J.; VIPOND, I.B.; REGAN, F.M.; WEDGWOOD, K.; FEY R.E.; CAUL, E.O. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. **Epidemiol Infect.** (2003) 131(1):727-36.

MAST, T.C.; WANG, F.T.; SU, S.; SEEGER, J.D. Evidence of Herd Immunity and Sustained Impact of Rotavirus Vaccination on the Reduction of Rotavirus-Related Medical Encounters Among Infants from 2006 through 2011 in the United States. **Pediatr Infect Dis J** (2015) 34: 615-620.

MATHIJS, E.; DENAYER, S.; PALMEIRA, L.; BOTTELDOORN, N.; SCIPIONI, A.; VANDERPLASSCHEN, A.; et al. Novel norovirus recombinants and of GII.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium. **Virology** (2011) 8:310.

MATSUI, S.M.; GREENBERG, H.B. Immunity to calicivirus infection. **J Infect Dis** (2000) 181: 331-335.

MATTISON, K.; GRUDESKI, E.; AUK, B.; CHAREST, H.; DREWS, S.J.; FRITZINGER, A.; et al. Multicenter comparison of two norovirus ORF2-based genotyping protocols. **J. Clin. Microbiol.** (2009) v. 47, n. 12, p. 3927-32.

MEDICI, M.C.; TUMMOLO, F.; MARTELLA, V.; GIAMMANCO, G.M.; DE GRAZIA, S.; ARCANGELETTI, M.C.; et al. Novel recombinant GII.P16_GII.13 and GII.P16_GII.3 norovirus strains in Italy. **Virus Res.** (2014) 8; 188:142-5.

MENDES, P.S.; RIBEIRO, H.D.A.C.; MENDES, C.M. Temporal trends of overall mortality and hospital morbidity due to diarrhoeal disease in Brazilian children younger than 5 years from 2000 to 2010. **J Pediatr.** (2013) v. 89, n. 3, p. 315-25.

MOORE, S.R.; LIMA, N.L.; SOARES, A.M.; ORIÁ, R.B.; PINKERTON, R.C.; BARRETT, L.J.; et al. Prolonged episodes of acute diarrhoea reduce growth and increase risk of persistent diarrhoea in children. **Gastroenterology** (2010) v. 139, n. 4, p. 1156-64.

MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. Enteropatia Ambiental. **Estudos Avançados** (2003) v.17, n. 48, p. 137-149.

MS (Ministério da Saúde). Resolução nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **MS** (2011). Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 21 de maio de 2017.

NAHAR, S.; AFRAD, M.H.; MATTHIJNSSENS, J.; RAHMAN, M.Z.; MOMTAZ, Z.; YASMIN, R.; et al. Novel intergenotype human norovirus recombinant GII.16/GII.3 in Bangladesh. **Infect Genet Evol** (2013) 20:325–9.

NOEL, J.S.; FANKHAUSER, R.L.; ANDO, T.; MONROE, S.S.; GLASS, R.I. Identification of a distinct common strain of “Norwalk-like viruses” having a global distribution. **J. Infect. Dis.** (1999) 179:1334–1344.

OKA, T.; WANG, Q.; KATAYAMA, K.; SAIF, L. Comprehensive review of human sapoviruses. **CMR** (2015) 28: 32-53.

O'NEILL, P.D.; MARKS, R.J. Bayesian model choice and infection route modelling in an outbreak of Norovirus. **Stat Med** (2005) 24: 2011-2024.

O'RYAN, M.; RIERA-MONTES, M.; LOPMAN, B. Norovirus in Latin America: Systematic Review and Meta-analysis. **Ped Infect Dis Journal** (2017) Feb - Vol 36 - Issue 2 - p 127–134.

PARK, G.W.; VINJÉ, J.; SOBSEY, M.D. The comparison of UV and chlorine disinfection profiles of murine norovirus (MNV-1), feline calicivirus (FCV), and coliphage MS2. **ASM**. (2006) Orlando, Florida.

PARKS, C.G.; MOE, C.L.; RHODES, D.; LIMA, A.; BARRETT, L.; et al. Genomic diversity of "Norwalk like viruses" (NLVs): pediatric infections in a Brazilian shantytown. **J Med Virol** (1999) 58:426-434.

PATEL, M.M.; WIDDOWSON, M.A.; GLASS, R.I.; AKAZAWA, K.; VINJÁ, J.; PARASHAR, U.D.; Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. **Emerg Infect Dis** (2008) 14:1224-1231.

PAYNE, D.C.; VINJÉ, J.; SZILAGYI, P.G.; EDWARDS, K.M.; STAAT, M.A.; WEINBERG, G.A.; et al. Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. **N Engl J Med** (2013) 368(12): 1121-1130.

PLATTS-MILLS, J.A.; BABJI, S.; BODHIDATTA, L.; GRATZ, J.; HAQUE, R.; HAVT, A.; et al. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). **Lancet Glob Health** (2015) Sep; 3(9):e564-75.

PRASAD, B.V.; HARDY, M.E.; DOKLAND, T.; BELLA, J.; ROSSMANN, M.G.; ESTES, M.K. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. **Science** (1999) 286: 287-290.

RABONI, S. M.; DAMASIO, G. A.; FERREIRA, C. E.; PEREIRA, L. A.; NOGUEIRA, M. B.; VIDAL, L. R.; et al. Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. (2014) v. 109, n. 4, p. 428-435.

RAMANI, S.; ATMAR, R.L.; ESTES, M.K. Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. **Curr. Opin. Gastroenterol**. (2014) 30, 25–33.

RAMIREZ, K.; WAHID, R.; RICHARDSON, C.; BARGATZE, R.F.; EL-KAMARY, S.S.; SZTEIN, M.B.; PASETTI, M.F. Intranasal vaccination with an adjuvanted Norwalk virus-like particle vaccine elicits antigen-specific B memory responses in human adult volunteers. **Clin. Immunol**. (2012) 144(2):98-108.

ROCHA-PEREIRA, J.; CUNHA, R.; PINTO, D.C.; SILVA, A.M.; NASCIMENTO, M.S. (E)-2-styrylchromones as potential anti-norovirus agents. **Bioorg Med Chem** (2010) 18:4195–4201.

ROCKX, B.; DE WIT, M.; VENNEMA, H.; VINJE, J.; DE BRUIN, E.; VAN DUYNHOVEN, Y.; KOOPMANS, M. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. **Clin Infect Dis** (2002) 35(3):246–53.

ROSSIGNOL, J.F.; EL-GOHARY, Y.M. Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **Aliment. Pharmacol Ther.** (2006) 15;24(10):1423-30.

ROUHANI, S.; YORI, P.P.; OLORTEGUI, M.P.; et al. Norovirus infection and acquired immunity in 8 countries: results from MAL-ED study. **Clin Inf. Dis.** (2016) May 15; 62(10):1210-7.

RUVOËN-CLOUET, N.; BELLLOT, G.; LE PENDU, J. Noroviruses and histo-blood groups: The impact of common host genetic polymorphisms on virus transmission and evolution. **Rev. Med. Virol.** (2013) 23, 355–366.

SÁ, A.C.C.; GÓMEZ, M.M.; LIMA, I.F.N.; QUETZ, J.S.; HAVT, A.; ORIÁ, R.B.; LIMA, A.A.; LEITE, J.P.G.; Group a rotavirus and norovirus genotypes circulating in the northeastern Brazil in the post-monovalent vaccination era. **J of Medical Virology** (2015). doi: 10.1002/jmv.

SANTOS, N.; SOARES, C.; *Viroses entéricas*. In: SANTOS, N.; ROMANOS, M.T.; WIGG, M.; **Introdução à virologia humana** (2008). 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 147 – 174.

SANTOS, V.S.; GURGEL, R.Q.; CAVALCANTE, S.M.; KIRBY, A.; CAFÉ, L.P.; SOUTO, M.J.; et al. Acute norovirus gastroenteritis in children in a highly rotavirus-vaccinated population in Northeast Brazil. **J Clin Virol.** (2017) Mar; 88:33-38.

SIEBENGA, J.J.; VENNEMA, H.; ZHENG, D.P.; VINJÉ, J.; LEE, B.E.; PANG, X.L.; HO, E.C.; et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007. **J Infect Dis** (2009) 200:802–812.

SIMON, A.; SCHILDGEN, O.; MARIA EIS-HUBINGER, A.; HASAN, C.; BODE, U.; et al. Norovirus outbreak in a pediatric oncology unit. **Scand J Gastroenterol** (2006) 41:693-699.

SIQUEIRA, J.A.M.; LINHARES, A.C.; CARVALHO, T.C.N.; ARAGÃO, G.C.; OLIVEIRA, D.S.; SANTOS, M.C.; et al. Norovirus infection in children admitted to hospital for acute gastroenteritis in Belém, Pará, Northern Brazil. **J Med Virol** (2013a) 85: 737±744.

SIQUEIRA, J.A.; LINHARES, A.C.; GONÇALVES, M.S.; CARVALHO, T.C.; JUSTINO, M.C.; MASCARENHAS, J.D.; GABBAY, Y.B. Group A rotavirus and norovirus display sharply distinct seasonal profiles in Belém, northern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** (2013b) v. 108, n. 5, p. 661-664.

SOSNOVTSEV, S.V.; GREEN, K.Y. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. **Virology** (2000) 277: 193-203.

- SOSNOVTSEV, S.V.; BELLLOT, G.; CHANG, K.O.; ONWUDIWE, O.; GREEN, K.Y. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. **J. Virol.** (2005) 79:4012–4024.
- STRAUB, T.M.; HÖNER, Z.U.; BENTRUP, K.; OROSZ-COGLAN, P.; DOHNALKOVA, A.; MAYER, B.K; et al. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. **Emerg Infect Dis** (2007) 13(3): 396-403.
- SUPADEJ, K.; KHAMRIN, P.; KUMTHIP, K.; KOCHJAN, P.; YODMEEKLIN, A.; USHIJIMA, H.; MANEEKARN, N. Wide variety of recombinant strains of norovirus GII in pediatric patients hospitalized with acute gastroenteritis in Thailand during 2005 to 2015. **Infect Genet Evol.** (2017) Apr 28; 52:44-51.
- TALAL, A.H.; MOE, C.L.; LIMA, A.A.; WEIGLE, K.A.; BARRETT, L.; et al. Soroprevalence and soroincidence of Norwalk-like virus infection among Brazilian infants and children. **J Med Virol** (2000) 61:117-124.
- TAN, D.; DENG, L.; WANG, M.; LI, X.; MA, Y.; LIU W. High prevalence and genetic diversity of noroviruses among children with sporadic acute gastroenteritis in Nanning City, China, 2010-2011. **J. Med. Virol.** (2015) 87(3):498-503.
- TAN, M.; HUANG, P.; XIA, M.; FANG, P.A.; ZHONG, W.; MCNEAL, M.; et al. Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. **J. Virol.** (2011) 85(2):753-64.
- TANIUCHI, M.; VERWEIJ, J.J.; NOOR, Z.; SOBUZ, S.U.; LIESHOUT, L.V.; PETRI JR, W.A.; et al. High Throughput Multiplex PCR and Probe-based Detection with Luminex Beads for Seven Intestinal Parasites. **Am J Trop Med Hyg** (2011) 84(2): 332–337.
- TANIUCHI, M.; SOBUZ, S.U.; BEGUM, S.; PLATTS-MILLS, J.A.; LIU, J.; YANG, Z.; et al. Etiology of diarrhea in Bangladeshi infants in the first year of life analyzed using molecular methods. **J Infect Dis.** (2013) 208(11):1794-802.
- THIELMAN, N.M.; GUERRANT, R.L. Acute infectious diarrhoea. **N Engl J Med.** (2004) v. 350, p. 38–47.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res** (1997) 25: 4876-4882.
- THORNE, L.G.; GOODFELLOW, I.G. Norovirus gene expression and replication. **J. Gen. Virol.** (2014) 95 Pt 2:278-91.
- THORNE, L.; ARIAS, A.; GOODFELLOW, I. Advances Toward a Norovirus Antiviral: From Classical Inhibitors to Lethal Mutagenesis. **J.Infect. Dis.** (2016) 213 1:S27-31.
- TRANG, N.V.; VU, H.T.; LE, N.T.; HUANG, P.; JIANG, X.; ANH, D.D. Association between norovirus and rotavirus infection and histo–blood group antigen types in Vietnamese children. **J Clin Microbiol** (2014) 52: 1366–74.

TSUGAWA, T.; NUMATA-KINOSHITA, K.; HONMA, S.; NAKATA, S.; TATSUMI, M.; et al. Virological, serological, and clinical features of an outbreak of acute gastroenteritis due to recombinant genogroup II norovirus in an infant home. **J Clin Microbiol** (2006) 44:177-182.

TU, E.T.; BULL, R.A.; KIM, M.J.; MC IVIR, C.J.; HERON, I.; MC IVER, C.J.; et al. Norovirus excretion in an aged- care setting. **J Clin Microbiol** (2008) 46:2119-21.

VAN BEEK, J.; AMBERT-BALAY, K.; BOTTELDOORN, N.; EDEN, J.S.; FONAGER, J.; HEWITT, J.; et al; NORONET. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II. 4, late 2012. **Euro Surveill.** (2013) 18(1):pii=20345.

VASHIST, S.; URENA, L.; GONZALEZ-HERNANDEZ, M.B.; CHOI, J.; ROUGEMONT, A.; ROCHA-PEREIRA, J.; et al. The molecular chaperone Hsp90 is a therapeutic target for noroviruses. **J Virol** (2015) 89(12): 6352-6363.

VEJA, E.; BARCLAY, L.; GREGORICUS, N.; SHIRLEY, S.H.; LEE, D.; VINJÉ, J. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States. **J Clin Microbiol** (2014) 52(1): 147-155.

VEGA, E.; BARCLAY, L.; GREGORICUS, N.; WILLIAMS, K.; LEE, D.; VINJÉ, J. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. **Emerg. Infect. Dis.** (2011) v. 17, n. 8, p. 1389-1395.

VINJÉ, J.; VENNEMA, H.; MAUNULA, L.; BONSDORFF, C.H.V.; HOEHNE, M.; SCHREIER, E.; et al. International Collaborative Study to Compare Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection and Genotyping of Noroviruses. **J Clin Microbiol** (2003) 41:1423-33.

VINJE, J. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. **J Clin Microbiol** (2015) 53(2): p. 373-381.

VONGPUNSAWAD, S.; PRASAD, B.V.; ESTES, M.K. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. **J Virol** (2013) 87(9):4818-4825.

WANG, Q.; ZHANG, Z.; SAIF, L.J. Stability of and attachment to lettuce by culturable porcine sapovirus surrogate for human caliciviruses. **Appl Environ Microbiol** (2012) 78(11): 3932-3940.

WHITE, P.A.; HANSMAN, G.S.; LI, A.; DABLE, J.; ISAACS, M.; FERSON, M.; et al. Norwalk-like virus 95/96-US strain is a major cause of gastroenteritis outbreaks in Australia. **J. Med. Virol.** (2002) 68:113–118.

WHITE, P.A. Evolution of norovirus. **Clin Microbiol Infect** (2014) 20:741–5.

WHO (*WORLD HEALTH ORGANIZATION*). Diarrhoeal disease. GENEVA: **WHO** (2013). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>>. Acesso em: 21 de maio de 2017.

WHO (*WORLD HEALTH ORGANIZATION*). World Health Statistics. Geneva: WHO (2014). Disponível em: <www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/en/>. Acesso em: 21 de maio de 2017.

WIDDOWSON, M.A.; CRAMER, E.H.; HADLEY, L.; BRESEE, J.S.; BEARD, R.S.; BULENS, S.N.; et al. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus—United States, 2002. **J. Infect. Dis.** (2004) 190:27–36.

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SANCHEZ-FAUQUIER, A.; Viruses causing gastroenteritis. **Clin Microbiol Infect** (2003) 9:247-262.

YEN, C.; WIKSWO, M.E.; LOPMAN, B.A.; VINJE, J.; PARASHAR, U.D.; HALL, A.J. Impact of an emergent norovirus variant in 2009 on norovirus outbreak activity in the United States. **Clin. Infect. Dis** (2011) 53:568–571.

ZAMBRUNI, M.; LUNA, G.; SILVA, M.; BAUSCH, D.G.; RIVERA, F.P.; VELAPATINO, G.; et al. High Prevalence and Increased Severity of Norovirus Mixed Infections Among Children 12-24 Months of Age Living in the Suburban Areas of Lima, Peru. **J Pediatric Infect Dis Soc** (2016) Sep; 5(3):337-41.

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

ZHENG, D.P.; WIDDOWSON, M.A.; GLASS, R.I.; VINJÉ, J. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. **J. Clin. Microbiol** (2010) 48: 168-77.

ANEXO A – COMITÊ NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 760/2006

Registro CONEP: 12729 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 236/05 Processo nº 25000.017262/2006-38
Projeto de Pesquisa: "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil," Protocolo (Re-ICIDR) DMID 06-0071, versão 3.0 – Tradução revisada em 23/11/2005. Pesquisador Responsável: Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Instituição: Universidade Federal do Ceará /CE
Patrocinador: National Institute of Allergy and Infectious Diseases - NIAID
Área Temática Especial: Genética Humana; Cooperação Estrangeira

Após se proceder à análise das respostas ao Parecer CONEP nº 352/2006, referente ao projeto de pesquisa supracitado, considerou-se em geral atendidas/esclarecidas a maioria das questões. No entanto cabem ainda as seguintes considerações:

1. A resposta referente à questão 5 deve ser melhor esclarecida no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, devendo estar explicitada a responsabilidade do pesquisador mediante qualquer dano. Não basta apenas a citação quanto ao direito a reclamar legalmente.
2. Com relação à questão 6, foi anexado o encaminhamento solicitando análise e parecer do Comitê de Ética da Universidade de Virginia, EUA (país de origem). Aguarda-se, portanto, o documento de aprovação por Comitê de Ética em Pesquisa desse país.
3. Quanto à questão 7, o pesquisador concorda com as citações das resoluções do CNS referentes à interrupção do estudo. Entretanto, deve estar esclarecido no próprio parágrafo da pág. 45 do protocolo as referências às resoluções e/ou anexar declaração de que caso haja necessidade de interrupção do estudo, a mesma se dará conforme o disposto nos itens III.3."z" e VII.13."f" da Res. CNS196/96 e item III.2."e" da Res. CNS 251/97.
4. A questão 8 foi parcialmente atendida. Nos critérios de inclusão não foi feita a referência aos 2000 familiares que serão doadores do material genético.
5. Em atendimento à questão 14, relativa ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE, foram apresentados dois TCLE (um para a pesquisa com micronutrientes e outro para a pesquisa genética) em atendimento aos sub-itens da referida questão, porém com datas de versão de 08/04/2005, anterior à versão apresentada inicialmente (23/11/2005) e anterior à data do Parecer CONEP 352/2006 (datado de 20/04/2006). Esclarecer. Entenda-se que as versões do TCLE devem constar data posterior ao parecer da CONEP.
6. No TCLE específico para a pesquisa para micronutrientes, deve ser excluída a frase que considera como benefício a assistência médica gratuita e o fornecimento gratuito dos suplementos em teste. Este fato poderia ser considerado como infringente à autonomia pois pode ser considerada uma

Cont. Parecer CONEP Nº 760/2008

possível indução ao sujeito da pesquisa, infringindo a sua autonomia, uma vez que não se caracteriza realmente como benefício para os sujeitos, já que o acesso a tratamento deve ser garantido a todos. Tal frase poderia ser colocada, por exemplo, num item denominado "custos".

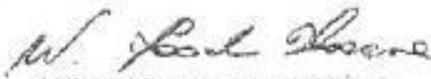
7. No TCLE específico para a pesquisa genética não cabe referências a administração do medicamento em estudo, mencionada em alguns itens. Rever.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96 manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com a seguinte recomendação a ser acompanhada pelo CEP que informará a CONEP:

- Que sejam atendidas as questões acima, antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação

Brasília, 14 de julho de 2008.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador de CONEP/CNS/MS

ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFC

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 338/09

Fortaleza, 20 de novembro de 2009

Protocolo COMEPE nº 238/05

Pesquisador responsável: Aldo Ângelo Moreira Lima

Deptº./Serviço: Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC

Título do Projeto: "Intervenção com micronutrientes e impacto a longo prazo no Brasil - Subprojeto 2A"

Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou a realização do subprojeto 2A na reunião do dia 19 de novembro de 2009 nas cidades de Crato, Picos, Cajazeiras, Sousa, Limoeiro e Pacajus cujas declarações de anuência foram apresentadas.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Mirian Parente Monteiro.

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

*Intervenção com Micronutrientes e Impacto a Longo Prazo no Brasil
(Semi-Árido Brasileiro: Objetivos 2a e 2c)*

Nome do Participante _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando sua criança para participar de uma pesquisa de genética para infecções gastrointestinais e impedimento de crescimento e desenvolvimento. Este estudo é uma parceria entre a Universidade Federal do Ceará e a Universidade da Virgínia, nos Estados Unidos. Amostras de fezes, dados antropométricos e dados sócio-culturais serão coletados e examinados. Faremos testes de DNA nas amostras coletadas para ver as características hereditárias que podem previamente produzir infecções gastrointestinais ou impedimento do crescimento e desenvolvimento.

O objetivo deste estudo é aprender sobre a tendência para infecções gastrointestinais e seus efeitos no desenvolvimento. O objetivo do teste genético é identificar os fatores que contribuem para o desenvolvimento de certas doenças.

Para participar deste estudo você deve concordar com os termos aqui expostos.

O que estamos tentando descobrir:

Sua criança foi selecionada porque mora numa cidade situada na região do semi-árido brasileiro e está na faixa etária entre 2 e 36 meses, além de não apresentar sintoma diarreico nos últimos 15 dias antes da coleta das amostras

Nosso grupo de pesquisa tem estudado o impacto das doenças diarreicas em crianças de comunidades carentes de Fortaleza. Os estudos realizados permitiram a associação entre as diarreias persistentes e algumas infecções entéricas específicas com a ruptura da barreira intestinal, provocando alterações na sua função absorptiva e predispondo crianças a uma maior carga diarreica. Observamos que a ocorrência de doenças diarreicas nos dois primeiros anos de vida e a presença de determinados patógenos entéricos, podem influenciar no crescimento linear da criança. Episódios de diarreia persistente nos dois primeiros anos de vida mostraram ter associação com um déficit de crescimento de 1,5 a 4cm aos 4 a 6 anos de idade nessas crianças. Além disso, a idade de início da criança na escola e a idade por ano escolar são significativamente atrasadas pelas doenças diarreicas ocorridas no início da infância.

Na busca por alternativas para a diminuição do impacto causado pelas doenças diarreicas causadas por vírus, bactérias ou parasitas, observamos a grande eficiência da solução de re-hidratação oral baseada em glutamina quando comparada à tradicional solução à base de glicose. Além disso, temos testado a influência da suplementação de micronutrientes, como zinco, vitamina A e arginina, na dieta de crianças susceptíveis às doenças diarreicas, observando a redução no número de crianças doentes.

Estes estudos têm sido realizados em duas comunidades carentes de Fortaleza: Parque Universitário e Gonçalves Dias, ambas situadas em Fortaleza e próximas à Faculdade de Medicina. Acompanhando os quadros diarreicos dessas duas comunidades ao longo dos últimos 20 anos, observamos que mesmo nas crianças que não apresentam diarreia como sintoma, ainda existe uma alta prevalência de inflamação intestinal e de enteropatógenos que podem oportunamente causar as doenças diarreicas quando as defesas imunológicas são reduzidas. Isso vem acontecendo principalmente em virtude de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e da carência de uma dieta nutricional balanceada.

Para que possamos realmente avaliar o impacto lesivo da presença destes agentes infecciosos, principalmente quando não há diarreia, se faz necessária a avaliação destes agentes em crianças que não residem nessas comunidades. Os resultados deste estudo para os participantes serão mensurados em termos de conhecimento do risco para as doenças diarreicas. A sociedade em geral se beneficia de qualquer redução nestas doenças da pobreza.

O que acontecerá:

Existem duas partes para este estudo:

1. Um profissional de saúde (enfermeira e/ou agente de saúde) coletará uma amostra de fezes e um pouco de saliva, através de um bochecho, de sua criança;
2. Um questionário será aplicado para coletar informações sócio-ambientais;
3. Medidas antropométricas serão também verificadas e registradas em um formulário;
4. As amostras serão enviadas para o Laboratório de Doenças Infecciosas para realizar testes específicos para este estudo. As amostras de fezes serão avaliadas através de métodos e técnicas de biologia molecular para a detecção de bactérias que prejudicam o intestino;
5. Suas amostras ficarão armazenadas por 5 anos após o final do estudo para futuras validações dos testes.

Benefícios:

A detecção de helmintos e protozoários, através do exame parasitológico de fezes, ou de crescimento de bactéria reconhecidamente prejudicial ao intestino será informada aos responsáveis e uma indicação de tratamento será indicada pelo médico pediatra responsável pelo estudo.

Riscos:

Não existem riscos físicos, sociais ou psicológicos neste estudo.

Confidencialidade:

A confidencialidade e a privacidade dos dados de sua criança serão resguardadas, segundo normas éticas brasileiras.

Responsabilidade em Caso de Danos:

Se seu filho apresentar qualquer dano como resultado direto do estudo, você deverá entrar em contato com o Dr. Aldo Lima no fone: 3366 8437 para receber a terapia necessária. Qualquer dano resultante de sua participação será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e assistência integral que você passa a ter direito ao assinar este formulário de consentimento e entrar na pesquisa, pois todo dano mediante o estudo é de inteira responsabilidade do pesquisador.

Para quem ligar:

Se você tem: (1) alguma questão sobre o estudo, por favor ligue para Dr Aldo A.M. Lima, Unidade de Pesquisa Clínica, UFC (Tel.: 3366 8445); (2) alguma questão sobre seus direitos como participante de um estudo, por favor ligue para Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE), Tel.: 3366.8346, ou peça a alguém do estudo para ajudar você a contatar com as pessoas citadas acima.

Direito de desistir:

A participação de sua criança neste estudo é completamente voluntária. Você é livre para retirá-la do estudo a qualquer momento sem prejuízos. Apenas avise a um dos membros da equipe.

Nome do Sujeito
(Se < 18 anos)

Pai ou Guardião Legal
(NOME LETRA FORMA)

Pai ou Guardião Legal
(ASSINATURA)

dd/ mm/ ano

Assinatura da Testemunha

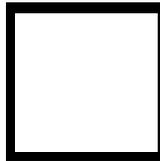
dd/ mm/ ano

Assinatura do Membro da Pesquisa

dd/ mm/ ano


Dra. Miriam Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO D – QUESTIONÁRIO

FORMULÁRIO			
ETIOLOGIA DE DIARREIA DO SEMI-ÁRIDO			
Caso não exista resposta para alguma pergunta, escreva ND como resposta.			
#	Questão	Código	Resposta
01	Data da Aplicação do Questionário	(dd/mmm/aa)	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>
Informações sobre a criança:			
02	Data de nascimento	(dd/mmm/aa)	<input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/>
03	Sexo	1-masculino; 2-feminino	<input type="checkbox"/>
04	Alimentação da criança	1-amamentação exclusiva; 2-amamentação não-exclusiva; 3-não amamenta mais; 4-nunca foi amamentada; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
05	Se a resposta anterior for 3 (não amamenta mais), por quanto tempo a criança foi amamentada?	meses	<input type="text"/> <input type="text"/>
Antropometria:			
06	Peso	kg	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
07	Altura	cm	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
08	Circunferência da cabeça	cm	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Informações sobre o responsável:			
09	Grau de parentesco com a criança	1-mãe; 2-pai; 3-avô (o); 4-vizinha(o); 5-tia (o), 6-outro	<input type="checkbox"/>
10	Caso a resposta à questão anterior seja 6 (outro parentesco), favor especificar.		_____

11	Idade da mãe da criança	anos	<input type="text"/> <input type="text"/>
12	Grau de escolaridade da mãe	1- não estudou; 2-primário incompleto; 3-primário completo; 4-secundário incompleto; 5-secundário completo; 6-superior incompleto; 7-superior completo; 9-não sabe	<input type="text"/>
13	Idade da primeira gestação	anos	<input type="text"/> <input type="text"/>
Condições sócio-econômicas e higiênico-sanitárias da família da criança:			
14	Qual o tipo de casa em que a criança vive?	1-talpa; 2-alvenaria; 3-mista; 4-outra; 9-não sabe	<input type="text"/>
15	Caso a resposta à questão anterior seja 4 (outro tipo de habitação), favor especificar.		_____
16	Número total de cômodos/compartimentos da casa		<input type="text"/> <input type="text"/>
17	Número total de habitantes da casa (crianças e adultos)		<input type="text"/> <input type="text"/>
18	Número de habitantes da casa menores de 5 anos		<input type="text"/> <input type="text"/>
19	Renda familiar (em salários mínimos)	1- < 1/2; 2- 1/2 a 1; 3-1 a 2; 4-2 a 3; 5-3 a 5; 6- >5; 9-não sabe	<input type="text"/>
20	A água de beber da casa é proveniente de	1- água encanada; 2-poço profundo; 3-cacimba; 4-carroça; 5-rio/açude; 6-sistema; 7-carro pipa; 8-água mineral; 9-não sabe; 10-outra fonte	<input type="text"/>
21	Caso a resposta à questão anterior seja 10 (outra fonte de água), favor especificar.		_____

22	O que faz antes de utilizar a água para beber?	1- ferve; 2-usa filtro; 3-usa solução de cloro; 4-nenhuma ação; 5-outra; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
23	Caso a resposta à questão anterior seja 5 (outra ação), favor especificar.		_____
24	Tipo de esgotamento sanitário da casa	1-fossa; 2-rede/esgoto público (sanear); 3-sem sistema de esgoto	<input type="checkbox"/>
25	Há sanitário dentro da casa?	1-sim; 2-não	<input type="checkbox"/>
26	Existe água corrente e sabão para lavar as mãos perto do sanitário?	1-sim; 2-não	<input type="checkbox"/>
27	Com qual frequência água corrente e sabão são utilizados para lavar as mãos?	1-sempre; 2-frequentemente; 3-poucas vezes; 4-raramente; 5-nunca; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
28	Crianças menores de 5 anos defecam no chão da casa/quintal?	1-sempre; 2-frequentemente; 3-poucas vezes; 4-não ou raramente; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
29	Animais costumam ficar dentro de casa ou ao redor (no quintal)?	1-sim; 2-não; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
30	Caso a resposta à questão anterior seja 1 (sim), favor especificar qual(is) animal(is).		_____
Condições clínicas da criança			
31	Sua criança apresentou 3 ou mais fezes líquidas nas últimas 24 horas? (CASO A RESPOSTA SEJA NÃO, VÁ PARA A QUESTÃO 38)	1-sim; 2-não	<input type="checkbox"/>

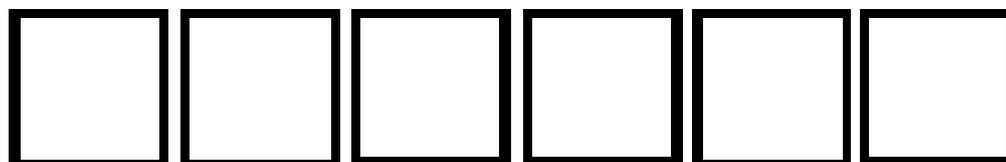
32	Caso a resposta à questão anterior seja 1 (sim), favor especificar a quantos dias a criança vem apresentando diarreia.		<input type="text"/> <input type="text"/>
33	Quantas evacuações em 24 horas? (Maior número recordado)		<input type="text"/> <input type="text"/>
34	Sinais/sintomas observados pelo guardião ou reportados pela criança:		
34.1	Dor abdominal	1- sim; 2-não; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
34.2	Vômito		<input type="checkbox"/>
34.3	Muco nas fezes		<input type="checkbox"/>
34.4	Sangue nas fezes		<input type="checkbox"/>
34.5	Fraqueza		<input type="checkbox"/>
34.6	Inquietação		<input type="checkbox"/>
34.7	Tosse ou sintomas respiratórios		<input type="checkbox"/>
34.8	Desidratação (Entrevistador, favor se reportar à tabela 1, em anexo, para classificação de desidratação ao final do questionário)	1-moderada; 2-grave; 7-grau não identificado; 8-não está desidratada; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
34.9	Febre	1- sim; 2-não; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
34.9.1	Caso tenha realizado medida com termômetro, informe a maior medida recordada.	Medida em °C (ou ND)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
34.10	Outros sintomas ou doenças concomitantes	1- sim; 2-não; 9-não sabe	<input type="checkbox"/>
35	Caso a resposta à questão 34.10 seja 1 (sim), favor especificar.		<hr/> <hr/> <hr/>

36	A criança recebeu algum tratamento durante a diarreia?	1= sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>			
37	Caso a resposta à questão 36 seja 1 (sim), favor especificar.		<hr/> <hr/> <hr/> <hr/>			
38	Sua criança apresentou diarreia nos últimos 14 dias?	1= sim; 2=não; 9=não sabe	<input type="checkbox"/>			
Situação vacinal da criança						
39. A criança recebeu as seguintes vacinas? 1= sim; 2=não; 9=não sabe						
39.1	BCG <i>(ao nascer, contra formas graves de tuberculose)</i>		<input type="checkbox"/> ao nascer			
39.2	SRC <i>(sarampo, rubéola, caxumba, 12 meses)</i>		<input type="checkbox"/> 12 meses			
39.3	Hepatite B <i>(ao nascer, reforços em 1 e 6 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 1 mês	<input type="checkbox"/> 6 meses			
39.4	VORH <i>(vacina oral contra rotavírus humano; 2 e 4 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses			
39.5	Hib <i>(meningite e outras infecções causadas pelo <u>Haemophilus influenzae</u> tipo B; 2, 4 e 6 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses		
39.6	DPT: "Tríplice" <i>(difteria, tétano, coqueluche; 2, 4, 6 e 15 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses	<input type="checkbox"/> 15 meses	
39.7	VOP: "Gotinha" <i>(vacina oral contra pólio; 2, 4, 6 e 15 meses)</i>	<input type="checkbox"/> 2 meses	<input type="checkbox"/> 4 meses	<input type="checkbox"/> 6 meses	<input type="checkbox"/> 15 meses	

Questões para o entrevistador			
40	Foi coletada amostra de fezes?	1= sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
41	Foi coletada amostra de saliva?	1= sim; 2=não	<input type="checkbox"/>
42	A criança foi classificada como caso ou controle?	1= caso; 2=controle	<input type="checkbox"/>

Entrevistador: _____

Assinatura: _____



ANEXO

Tabela 1: Classificação dos graus de desidratação

PERGUNTAS	RESPOSTAS*					
	A		B		C	
Diarreias	Até 4 dejeções líquidas/dia	<input type="checkbox"/>	De 4 a 10 dejeções líquidas/dia	<input type="checkbox"/>	+ de 10 dejeções líquidas/dia	<input type="checkbox"/>
Vômitos	Ausente	<input type="checkbox"/>	Pouca quantidade	<input type="checkbox"/>	Muito frequente	<input type="checkbox"/>
Sede	Normal	<input type="checkbox"/>	Aumentada	<input type="checkbox"/>	Não pode beber	<input type="checkbox"/>
Urina	Normal	<input type="checkbox"/>	Pouca, escura	<input type="checkbox"/>	Nenhuma em 6h	<input type="checkbox"/>
Olhos	Normais	<input type="checkbox"/>	Fundos	<input type="checkbox"/>	Muito fundos	<input type="checkbox"/>
Boca e Língua	Molhadas	<input type="checkbox"/>	Secas	<input type="checkbox"/>	Ressecadas	<input type="checkbox"/>
Pele	Pressionada, volta ao normal	<input type="checkbox"/>	Pressionada, volta lentamente	<input type="checkbox"/>	Pressionada, volta muito lentamente	<input type="checkbox"/>
Desidratação	Caso apresente estes sintomas:		Caso apresente dois ou mais destes sintomas		Caso apresente dois ou mais destes sintomas	
	NÃO		SIM, MODERADA		SIM, GRAVE	

*As respostas A, B e C correspondem a intensidades crescentes dos sinais e sintomas de desidratação.

ANEXO E – MANUSCRITO RELACIONADO A DISSERTAÇÃO “Genetic diversity of norovirus strains, co-infections and nutritional status in children: a case-control study in the semiarid region of Brazil.”

Genetic diversity of norovirus strains, co-infections, and nutritional status in children: a case-control study in the semiarid region of Brazil

Rafhaella N.D.G. Gondim¹, Rafaela C. Pankov¹, Mara M.G. Prata¹, Pedro H.Q.S. Medeiros¹, Herlice N. Veras¹, Ana K.S. Santos¹, Lyvia M.C. Magalhães¹, Alexandre Havt¹, Tulio M. Fumian², Marize P. Miagostovich², Eric R. Houpt³, José Paulo G. Leite ², Aldo A.M. Lima¹.

Institutions: ¹ Institute of Biomedicine & Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil. ² Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil. ³ University of Virginia, USA.

Disclosures: The authors have no conflicts of interest or funding to disclose.

Running title: Norovirus from a Case-Control Study of Diarrhea in Brazilian Children.

Correspondent author: Rafaela NDG Gondim, MSc, R. Cel. Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CEP 60.430-270, CE, Brazil, Institute of Biomedicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

E-Mail: rafha_ndg@hotmail.com; Phones: +55 85 3366 8445 Or -8437

Word Count: 2487

Abstract

Norovirus (NoV) infection is a major global health problem with high morbid-mortality rates. However, the impact of NoV on child development remains poorly described. We wanted to investigate the genetic diversity of circulating NoV strains in children from the semiarid region of Brazil, and its associations with other co-infections and clinical/nutritional status. This case-control study was carried out with 2–36-months-old, being considered cases children who had at least one episode of diarrhea in the last 14 days. Detection and quantification of NoV were performed by RT-qPCR, followed by molecular and phylogenetic analysis. The prevalence of NoV was 45.2%. A lower z-score index was associated with the presence of NoV with weight for age – WAZ ($P = 0.034$), weight for height – WHZ ($P = 0.033$), and body mass index for age – BAZ ($P = 0.033$). In addition, NoV infection was associated with more frequent respiratory symptoms ($P = 0.0096$). GII.P7 (polymerase) and GII.3 (capsid) were the most frequent NoV genotypes, and analysis of the ORF 1-2 junction identified recombinant NoV strains in 80% of the sequenced samples. With regards to co-infections, among the positive cases of NoV, diarrheal episodes were associated with the presence of entero-aggregative *E. coli*, and simultaneous absence of *Cryptosporidium* and shiga toxin-producing *E. coli* ($P = 0.0167$). The present study highlighted the high genetic variability of NoV in the semiarid region of Brazil, and underlines its role in co-infections and infant nutritional status, thus contributing to better understandings of its epidemiology.

Key Words: Norovirus. Diarrhea. Pediatric. Nutritional status. Semiarid Brazilian region.

Introduction

Infectious diarrhea is the second most common cause of death in children under 5 years of age in developing countries [1]. Norovirus (NoV) is one of the main etiological agents, and is responsible for more than 90% of acute viral gastroenteritis (AGE) outbreaks, up to 200,000 deaths per year worldwide mainly in developing countries [2,3].

NoV belongs to the *Norovirus* genus within the *Caliciviridae* family. Its positive single-stranded RNA genome of approximately 7.5 kb is organized into three open reading frames (ORFs), encoding non-structural proteins (ORF1), while ORF2 and ORF3 encode the major capsid VP1 protein and the minor structural VP2 protein, respectively. Based on VP1 sequence similarity, NoV strains are classified into seven genogroups (GI – GVII) and over 40 genotypes; strains belonging to the GI, GII and GIV genogroups are known to infect humans [4,5,6]. NoV is constantly evolving by point mutation (antigenic drift) and genetic recombination. High recombination frequency among different genotypes has been reported in previous studies, most commonly near the ORF1-2 junction, therefore is recommended that both regions should be genotyped [6,7].

Non-severe episodes of diarrhea in the community are of great public health concern since it's associated with poor growth, impaired cognitive development, environmental enteropathy, and even mortality [8,9,10,11]. In Brazil, several studies have examined the molecular epidemiology of NoV in hospitalized children, outpatients, and day care centers [12,13,14]; however, most of these studies have been limited to symptomatic cases. Our study aimed to investigate the prevalence and genetic diversity of NoV in a case-control study in the semiarid region of northeastern Brazil, and its association with other enteropathogens, clinical symptoms, and nutritional status.

Material and methods

Study design and clinical samples

A transversal, case-control study was conducted in six cities (states) from the Northeast Region of Brazil: Cajazeiras (Paraíba), Crato (Ceará), Ouricuri (Pernambuco), Patos (Paraíba), Picos (Piauí) and Sousa (Paraíba). These cities were designated as representatives of the semiarid region in northeastern Brazil, and have over 50,000 inhabitants each (**Fig 1**). From April 2010 to March 2011, health workers collected fecal samples from children in the age group of 2–36 months old in health care units or during active surveillance, being considered cases children who had at least one episode of diarrhea in the last 14 days. An interview was conducted during subject enrollment, and detailed health information such as anthropometric measurements, breastfeeding status, clinical conditions, and occurrence of diarrhea were collected via a standardized questionnaire form.

We enrolled 130 (81 cases and 49 controls) by randomly selection, and an additional 36 NoV-positive samples were included, which were previously confirmed to be positive for NoV using the Luminex Bio-Plex[®] System technology (Bio-Rad, USA).

Ethical statement

This research was approved by the National Commission on Ethics in Research of Brazil and the Research Ethics Committee of the Federal University of Ceará (craft n°.550/2006, protocol n°.238/05). Written informed consent was signed by parents or guardians of the children during fecal specimen collection.

An initial screening was performed by the Luminex Bio-Plex[®] 200 System (Bio-Rad, USA) for different pathogens panels were used as follows: virus (rotavirus, norovirus, astrovirus, and sapovirus) [15]; bacteria (pathogenic *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella*

spp., *Campylobacter* spp., *Aeromonas* spp., and *Vibrio* spp.) [16,17]; protozoa (*Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Entamoeba histolytica*) [18].

Norovirus detection and molecular characterization

Virus RNA was purified from stool samples using the QIAamp Viral RNA™ extraction kit (QIAGEN, USA), according to the manufacturer's instructions. Quantitative assay was performed on an ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA) using a set of primers target the ORF1-2 fragments, probes and protocol previously described [19, 20].

Sequencing reactions was performed using an ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit and the ABI Prism 3130xl DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA) [19, 21, 22, 23]. The sequences were edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor (v.7.0.9.1) software. Consensual sequences were used to construct a phylogenetic dendrogram by the neighbor-joining method, using a matrix of genetic distances established under the Kimura two-parameter model with 2000 bootstrap replications for branch support using MEGA 6 computer package program (v.7.0.18) [24]. Recombinant strains previously detected by the genotyping tool were subjected to plot similarity analysis using the SimPlot program [25]. The nucleotide sequences obtained in this study were deposited into the National Center for Biotechnology Information (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) under the accession numbers MF101875-MF10195.

Statistical analysis

Bivariate analysis was initially performed. Fisher tests was conducted to compare categorical variables between groups with presence or absence of diarrhea, as well as NoV detection. T student tests for normal distribution data, and Mann Whitney tests for data without a normal distribution were used to compare the continuous variables between these groups.

Classification and Regression Tree (CART) analysis and Fisher's exact tests were used to investigate the impact of norovirus co-pathogen combinations. Statistical analyses were

performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) program, version 20 (IBM Corp., USA). *P*-values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Table 1 shows the characteristics of the studied population. There was no statistical difference among the parameters analyzed (age, gender, breastfeeding and socio-economic status) between the diarrhea cases and the healthy controls.

We detected an overall NoV prevalence of 45.2% (75/166). Among the NoV-positive samples, 72% and 28% were from diarrhea cases and healthy controls, respectively (**Table 2**). A trend towards higher viral load within diarrhea cases [$74.4 \times 10^8 \pm 2.8 \pm 10^{10}$ genome copies (gc)/g feces in diarrhea cases vs $1.62 \times 10^8 \pm 0.04 \times 10^{10}$ gc/g feces in controls ($P > 0.05$)]. NoV GII was detected in 94.6% (71/75), while GI was detected in 5.3% (4/75) of the positive samples. Comparison analysis of NoV infection between different cities showed that Ouricuri presented the highest number of NoV-positive samples (16.8%, 28/166), followed by Crato (11.4%, 19/166), Cajazeiras (7.2% 12/166), Souza (6%, 10/166), Patos (2.4%, 4/166), and Picos (1.2%, 2/166).

We successfully sequenced 25.3% (32/71) of the NoV GII strains by PCR (ORF1-2 region, n= 15) or nested-PCR (3' ORF1, n= 17). Based on the capsid region, the most dominant genotype was GII.3 (53.3%, 8/15), followed by GII.14 (20%, 3/15) and GII.4 New Orleans_2009 (13.3%, 2/15) (**Fig 2A**). Based on the polymerase region, the most frequent genotypes were GII.P7 (46.8%, 15/32) and GII.P16 (40.6%, 13/32) (**Fig 2B**). However, no specific genotype was significantly associated with diarrhea cases or healthy controls ($P > 0.05$). We identified high frequency of recombinant strains (80%, 12/15), which were classified as GII.P16-GII.3 (n = 8), GII.P7-GII.14 (n = 3), and GII.P7-GII.6 (n = 1). The temporal distribution of NoV genotypes throughout the study period (April 2010 to March 2011)

demonstrated that the GII.P16-GII.3 recombinant strain was detected in both years in four different months; circulation of GII.P7-GII.14 and GII.P7-GII.6 strains were restricted to the year of 2010, and GII.4 New Orleans_2009 strain was detected in August and November of 2010. The recombination breakpoint for two of the three detected strains (GII.P16-GII.3, GII.P7-GII.6) was analyzed via plot similarity (**Figs 3A and B**). For both strains, the recombination breakpoint was located upstream of the ORF junction, corroborating results obtained using the NoV genotyping tool and phylogenetic analysis.

In addition, nutritional parameters analyzed indicated that children infected with NoV presented decreased anthropometric z-scores (WAZ, WHZ, and BAZ values) when compared to non-infected children ($P < 0.05$) (**Table 3**). Interestingly, between all clinical features, only the respiratory symptoms were significantly with NoV presence ($P = 0.0096$, OR = 3.276, 95% confidence interval [CI] = 1.33 to 8.048).

We found that 78.6% (59/75) of NoV-positive samples was co-infected with other enteropathogens. The most prevalent pathogen detected was enteroaggregative *E. coli* (EAEC) (44%, $n = 33$). *Shigella* was associated with NoV positivity ($P = 0.0199$, OR = 3.0, 95% [CI] = 1.153 to 7.809), while EAEC was associated with the absence of NoV ($P = 0.0050$, OR = 2.463, 95% [CI] = 1.313 to 4.622) (**Fig 4**). Co-infections of NoV and other enteropathogens were also investigated by CART analysis to determine the associations between specific combinations of pathogens and diarrhea cases/healthy controls, and showed a significant association between diarrhea cases and the concomitant presence of EAEC coupled with the absence of *Cryptosporidium* and EHEC/STEC pathogens (Terminal Node 2) ($*P = 0.0167$, OR = 4.8, 95% [CI] = 1.100 to 1.838) (**Fig. 5**).

Discussion

In the present study, NoV detection rates in diarrheal samples ranged from 1.2-16.8% among the selected cities. Ouricuri (Pernambuco state), which showed the lowest human development index among all study sites [26], demonstrated the highest NoV prevalence rate. Previous studies showed high NoV infection rates in children affected with AGE in the northern region of Brazil (about 35%) [27,28]. Similar prevalence rates were also observed in a multicenter study, where mean NoV positivity from diarrheal stool specimens was found to be 23.5%, ranging from 7.1–32.8% across sites [10]. We found higher NoV loads in diarrheal samples without statistically significant. Other studies have also observed a trend towards higher NoV viral load in diarrheal samples [10,26]. Asymptomatic carriage of NoV strains has been observed in children, although still generally underestimated. Our study identified a NoV frequency of 28% in children without diarrhea. Subclinical NoV infection rates have been shown to be within 17–30% in children in their second year of life in developing countries [29,30,31].

The effects of malnutrition associated with severe NoV infection (induced weight loss, diminished protective immunity resulting in serial re-infections, reduced antiviral antibody responses and increased viral evolution) have been reported in both clinical and animal studies [32,33]. Previous studies indicated an association between early childhood malnutrition and NoV infection [10,29]. In our study, we found significant associations between NoV diagnosis and lower anthropometric WAZ, WHZ, and BAZ, thus illustrating the importance of investigating the NoV role in malnutrition. Among the study population, we observed a low prevalence for exclusive breastfeeding (6.6%), which was associated with high rates of NoV infection in some cities. Lima et al. [34] showed that breastfeeding plays a key role in preventing diarrhea and malnutrition.

We also explored extraintestinal symptoms in NoV-infected and healthy children. Our data demonstrated that the only clinical symptom statistically associated with NoV infection was respiratory disorders ($P = 0.0096$). In a study performed in Australia, Canada, and USA, Hall et al. [35] found similar percentage of NoV-infected children (< 5 years) presenting concomitant respiratory symptoms.

With regards to genetic characterization of NoV, the low frequency of NoV GI observed in our study is supported by previous studies that also showed low prevalence of this genogroup when compared with that of GII [36,37]. The low circulation of GII.4 observed in this study was unexpected, since it is well known that GII.4 strains are major causes of AGE. However, this genotype is generally linked with severe forms of the disease and outbreaks, and is the most prevalent genotype reported in studies involving hospitalized children or AGE outbreaks [5,38,39]. The only two GII.4 strains detected in this study were collected in 2010, and were classified as the New Orleans_2009 variant that circulated worldwide after 2009 [16,29,40,41]. This variant was first detected in the winter of 2009-2010 in the United States, and contributed to the rising number of AGE cases and outbreaks [42].

Genetic recombination is a very common phenomenon in NoV evolution, and is responsible for generating important changes to their genome to expand their diversity [43], and recombinant genotypes has been reported worldwide [15,20, 44,45,46,47]. In this study, the most prevalent recombinant strain was GII.P16-GII.3, which was detected in late 2010 and early 2011. In a previous study that investigated strains circulating in the northeastern region of Brazil in children who sought medical attention, the presence of the NoV GII.3 strain was reported [48]. Furthermore, in a surveillance study conducted in southeastern Brazil from 2003-2004, GII.3 was the second most frequently detected strain [49].

The polymerase genotype GII.P7 was the most frequent genotype found (46.8%) in this study, and has been shown to be a major genotype in Brazil since its first detection in 2005

[31,37]. This genotype was also described in a previous study that examined a rural community in the northern region of Brazil from 2008-2010 [50]. This polymerase genotype manifests in two different recombinant forms: GII.P7-GII.6 and GII.P7-GII.14. The GII.P7-GII.14 strain was detected in samples collected in Ouricuri between June and July 2010. In 2004, this recombinant form was detected in an AGE outbreak in southern Brazil [20].

The genotypes GII.Pe and GII.2 were only detected in a single child each. GII.Pe was first detected in Australia in 2008 [45], and has since been associated with the capsid genotypes GII.2, GII.3, GII.4, and GII.12 [40,51,52].

The interactions between NoV and other enteric pathogens have been studied in the past few years. In a study conducted in Brazil and seven other countries from three continents between 2009 and 2010, NoV was detected in 22.7% (1607/7077) of diarrheic fecal samples from children, of which 77.7% were co-infected with other enteropathogens, the most common were *Campylobacter*, *EAEC* and *Giardia*. However, symptomatic infection rates were unaffected by co-infections with other pathogens [10]. In our study, we found similar results; 78.6% of NoV infections were coupled with at least one other enteropathogen. Similar to previous findings by Rouhani's et al. [10], the most prevalent co-pathogen was *EAEC*. In another study conducted in northeast Brazil, prevalence of *EAEC* infection was significantly dependent on nutritional status [53].

The correlation between high rates of undernutrition and *EAEC* co-infection may be explained by the low-income status of the population studied, as well as the poor sanitary conditions and difficult access to the health care system. In a study conducted in China, the authors found that interactions between NoV and enteric bacteria require the presence of histo-blood group antigens (HBGA) in enteric bacteria [54]. HBGA was identified as a potential NoV receptor or co-receptor, and therefore, glycans transported by different enteric bacteria play important roles in enteric viral infections [55,56]. This may explain in part the co-occurrence

or absence of specific bacteria with specific viruses. However, the mechanisms underlying this phenomenon still need to be closely examined. This may be the key issue that can explain the relationship between the presence/absence of NoV with other enteric pathogens.

Our study has several limitations. Samples collection was performed at different times for each city. Therefore, NoV seasonality was not constant. In addition, more data on the dietary profiles of the subjects could lead to a better understanding of the effect of nutritional status on NoV infection. Moreover, the small sample size obtained from the initial population prevented better assessments of key factors, such as clinical symptoms and coinfection.

In conclusion, this was the first study that evaluated NoV genetic diversity in a broad epidemiologic study in children from the semiarid region of Brazil. Our data contributes to better understanding of NoV epidemiology and its health impacts, as it highlights the great genetic variability of this pathogen, and provides knowledge regarding its co-pathogens and association with malnutrition.

Acknowledgments

The authors have no conflicts of interest or funding to disclose. This work was supported by National Fund for Scientific and Technological Development – FNDCT (Finep nº. 0460.08), Excellence Program of Research (PROEP-CNPq/IOC) and General Coordination of Laboratories/Secretary of Health Surveillance, Ministry of Health.

REFERENCES

1. Walker CL, Aryee MJ, Boschi-Pinto C, Black RE. Estimating diarrhea mortality among young children in low and middle-income countries. *PLoS One* (2012) 7: e29151 doi: 10.1371/journal.pone.0029151 PMID: 22235266.

2. Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinj J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* (2008) 14:1224-1231. doi: 10.3201/eid1408.071114 PMID: 18680645.
3. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE; Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One* (2013) Sep 4 8(9):e72788. doi: 10.1371/journal.pone.0072788 PMID: 24023773.
4. Green KY, et al. Caliciviridae: The noroviruses, in: Knipe D M, Howley P M, Cohen J L, Griffin D E, Lamb R A, Martin M A, Racaniello V R, Roizman (Eds.). *Fields Virology* (2013), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 582–608.
5. Hoa Tran TN, et al. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *Journal of Clinical Virology* (2013) 56: 185–193. doi: 10.1016/j.jcv.2012.11.011 PMID: 23218993.
6. Kroneman A, Veja E, Vennema H, Vinj J, White PA, Hansman G, et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol* (2013) 158:2059–68. doi: 10.1007/s00705-013-1708-5 PMID: 23615870.
7. Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol* (2007) 88:3347–59. doi:10.1099/vir.0.83321-0 PMID: 18024905.
8. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* (2013) 382: 209–22. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60844-2 PMID: 23680352.
9. Guerrant RL, Oria RB, Moore SR, Oria MOB, Lima AAM. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. *Nutr Rev* (2008) 66: 487–505. doi: 10.1111/j.1753-4887.2008.00082.x. PMID: 18752473.
10. Lee KS, Kang DS, Yu J, Chang YP, Park WS. How to do in persistent diarrhea of children? : concepts and treatments of chronic diarrhea. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* (2012) Dec; 15(4):229-36. doi: 10.5223/pghn.2012.15.4.229 PMID: 24010092.
11. Lorntz B, Soares AM, Moore SR, Pinkerton R, Gansneder B, Bovbjerg VE, Guyatt H, Lima AM, Guerrant RL. Early childhood diarrhea predicts impaired school performance. *Pediatr Infect Dis J.* (2006) Jun; 25(6):513-20. doi: 10.1097/01.inf.0000219524.64448.90 PMID: 16732149.

12. Fumian TM, Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, Siqueira JA, Soares LS, et al. Detection of novel recombinant strain of norovirus in an African- descendant community from the Amazon region of Brazil in 2008. *Arch Virol* (2012) Dec; 157(12):2389-92. doi: 10.1007/s00705-012-1428-2 PMID: 22872050.
13. Andrade JSR, Rocha MS, Costa-Carvalho FA, Fioretti JM, Xavier MPTP, Nunes ZMA, et al. Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. *J of Clin Virol* (2014) 61 345-352. doi: 10.1016/j.jcv.2014.08.024 PMID: 25223919.
14. Santos VS, Gurgel RQ, Cavalcante SM, Kirby A, Café LP, Souto MJ, et al. Acute norovirus gastroenteritis in children in a highly rotavirus-vaccinated population in Northeast Brazil. *J Clin Virol.* (2017) Mar;88:33-38. doi: 10.1016/j.jcv.2016.10.015 PMID: 28160726.
15. Liu J, Kibiki G, Maro V, Maro A, Kumburu H, Swai N, Taniuchi M, Gratz J, Toney D, Kang G, Houpt E. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. *J Clin Virol* (2011) 50(4):308-13. doi: 10.1016/j.jcv.2010.12.009 PMID: 21256076.
16. Taniuchi M, Sobuz SU, Begum S, Platts-Mills JA, Liu J, Yang Z, Wang XQ, Petri WA Jr, Haque R, Houpt ER. Etiology of diarrhea in Bangladeshi infants in the first year of life analyzed using molecular methods. *J Infect Dis.* (2013) 208(11):1794-802. doi: 10.1093/infdis/jit507 PMID: 24041797.
17. Liu J, Gratz J, Maro A, Kumburu H, Kibiki G, Taniuchi M, Howlader AM, Sobuz SU, Haque R, Talukder KA, Qureshi S, Zaidi A, Haverstick DM, Houpt ER. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. *J Clin Microbiol.* (2012) 50 (1):98-103. doi: 10.1128/JCM.05416-11 PMID: 22075596.
18. Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, Sobuz SU, Lieshout LV, Petri WA Jr, Haque R, and Houpt ER. High Throughput Multiplex PCR and Probe-based Detection with Luminex Beads for Seven Intestinal Parasites. *Am J Trop Med Hyg* (2011) 84(2): 332–337. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0461 PMID: PMC3029193.
19. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* (2003) Apr;41(4):1548-57. PMID: 12682144.
20. Fumian TM, Andrade JS, Leite JP, Miagostovich MP. Norovirus recombinant strains isolated from gastroenteritis outbreaks in southern Brazil, 2004-2011. *PLoS One* (2016) 11(4):e0145391. doi: 10.1371/journal.pone.0145391 PMID: 27116353.

21. Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Lüthi TM. Norwalk-like viruses sequences in mineral waters: one year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol* (2002) 68: 1925–31. PMID: 11916714.
22. Kojima S, Kaheyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Vir Methods* (2002) 100: 107–14. PMID: 11742657.
23. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* (1999) 41:95–98.
24. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* (2016) Jul;33(7):1870-4. doi: 10.1093/molbev/msw054 PMID: 27004904.
25. Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., Ray, S.C. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* (1999).73, 152–160. PMID: 9847317.
26. Alam A, Qureshi SA, Vinjé J, Zaidi A. Genetic characterization of norovirus strains in hospitalized children from Pakistan. *J Med Virol.* (2016) Feb; 88(2):216-23. doi: 10.1002/jmv.24329 PMID: 26175018.
27. IPEA (Institute of Economic and Applied Research). Available from: <http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/consulta/>
28. Da Costa STP, Fumian TM, De Lima ICG, Siqueira JAM, Da Silva LD, Hernández JM, De Lucena MSS, Reymão TKA, Soares LS, Mascarenhas JDP, Gabbay YB. High prevalence of norovirus in children with sporadic acute gastroenteritis in Manaus, Amazon Region, northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2017), Rio de Janeiro: 1-5.
29. Fumian TM, Justino MC, D'Arc Pereira Mascarenhas J, Reymão TK, Abreu E, Soares L, et al. Quantitative and molecular analysis of noroviruses RNA in blood from children hospitalized for acute gastroenteritis in Belem Brazil. *J Clin Virol* (2013); 58:31-5. doi: 10.1016/j.jcv.2013.06.043 PMID: 23886502.
30. Platts-Mills JA, Babji S, Bodhidatta L, Gratz J, Haque R, Havt A, et al and The MAL-ED Network Investigators. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob Health* (2015) Sep; 3(9):e564-75. doi: 10.1016/S2214-109X(15)00151-5 PMID: 26202075.
31. Zambruni M, Luna G, Silva M, Bausch DG, Rivera FP, Velapatino G, et al. High Prevalence and Increased Severity of Norovirus Mixed Infections Among Children 12-24

Months of Age Living in the Suburban Areas of Lima, Peru. *J Pediatric Infect Dis Soc.* (2016) Sep; 5(3):337-41. doi: 10.1093/jpids/piv001 PMID: 27534674.

32. Ferreira MS, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MP, Fioretti JM, et al. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005–2008. *J. Med. Virol* (2010) 82, 1442–1448. doi: 10.1002/jmv.21831 PMID: 20572088.

33. Hickman D, Jones MK, Zhu S, Kirkpatrick E, Ostrov DA, Wang X, et al. The effect of malnutrition on norovirus infection. *MBio* (2014) Mar 4; 5(2):e01032-13. doi: 10.1128/mBio.01032-13 PMID: 24595373.

34. Beck MA, Handy J, Levander OA. Host nutritional status: the neglected virulence factor. *Trends Microbiol* (2004) 12:417– 423. doi: 10.1016/j.tim.2004.07.007 PMID: 15337163.

35. Lima AAM, Moore SR, Barboza MS Jr, Soares AM, Schleupner MA, Newman RD, et al. Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* (2000) May;181(5):1643-51. doi: 10.1086/315423 PMID: 10823764.

36. Hall G, McDonald L, Majowicz SE, Scallan E, Kirk M, et al. Respiratory symptoms and the case definition of gastroenteritis: an international analysis of the potential impact on burden estimates. *Epidemiol Infect* (2010) 138, 117–124. doi: 10.1017/S0950268809990112 PMID: 19493373.

37. Arvelo W, Sosa SM, Juliao P, López MR, Estevéz A, López B, et al. Norovirus outbreak of probable waterborne transmission with high attack rate in a Guatemalan resort. *J Clin Virol* (2012); 55:8–11. doi: 10.1016/j.jcv.2012.02.018 PMID: 22776162.

38. Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, Vieira CB, Xavier MP, Leite JP, Miagostovich MP. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (2011) 106, 942–947. PMID: 22241115.

39. Leshem E, Wikswo M, Barclay L, Brandt E, Storm W, Salehi E, et al. Effects and clinical significance of GII.4 Sydney norovirus, United States, 2012–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 19 (2013) 1231–8. doi:10.3201/eid1908.130458 PMID: 23886013.

40. Mathijs E, Denayer S, Palmeira L, Botteldoorn N, Scipioni A, Vanderplasschen A, et al. Novel norovirus recombinants and of GII.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium. *Virol J* (2011) 8: 310. doi: 10.1186/1743-422X-8-310 PMID: 21682917.

41. Fioretti JM, Bello G, Rocha MS, Victoria M, Leite JP, Miagostovich MP. Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS One* (2014) 25:e92988. doi: 10.1371/journal.pone.0092988 PMID: 24667283.
42. Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Williams K, Lee D, Vinjé J. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks United States. *Emerg Infect Dis* (2011) 17:1389–95. doi: 10.3201/eid1708.101837 PMID: 21801614.
43. White PA. Evolution of norovirus. *Clin Microbiol Infect* (2014) 20:741–5. doi: 10.1111/1469-0691.12746 PMID: 24980204
44. Bruggink LD, Moselen JM, Marshall JA. The comparative molecular epidemiology of GII.P7_GII.6 and GII.P7_GII.7 norovirus outbreaks in Victoria, Australia, 2012–2014. *Intervirology* (2016) 59(1):60–5. doi: 10.1159/000448100 PMID: 27553653.
45. Bruggink LD, Dunbar NL, Marshall JA. Emergence of GII.e as a major ORF 1 norovirus genotype and its associated ORF 2 GII.4 variant forms. *Infection, Genetics and Evolution* (2014) 22, 157–163. doi: 10.1016/j.meegid.2014.01.025 PMID: 24486568.
46. Hernandez JD, da Silva LD, Junior ECS, de Lucena MS, Soares LDAS, Mascarenhas JD, Gabbay YB. Analysis of uncommon norovirus recombinants from Manaus, Amazon region, Brazil: GII.P22/GII.5, GII.P7/GII.6 and GII.Pg/GII.1. *Infect Genet Evol* (2016) Apr; 39:365–71. doi: 10.1016/j.meegid.2016.02.007 PMID: 26861619.
47. Supadej K, Khamrin P, Kumthip K, Kochjan P, Yodmeeklin A, Ushijima H, Maneekarn N. Wide variety of recombinant strains of norovirus GII in pediatric patients hospitalized with acute gastroenteritis in Thailand during 2005 to 2015. *Infect Genet Evol.* (2017) Apr 28;52:44–51. doi: 10.1016/j.meegid.2017.04.025 PMID: 28461205.
48. Sá ACC, Gomez MM, Lima IFN, Quetz JS, Havt A, Oriá RB, Lima AAL, Leite JPG. Group a rotavirus and norovirus genotypes circulating in the northeastern Brazil in the post-monovalent vaccination era. *J. Med. Virol* (2015) Sep; 87(9):1480–90. doi: 10.1002/jmv.24144 PMID: 25982627.
49. Barreira DM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadovsky AD, Leite JP, et al. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J Clin Virol* (2010) 47:60–4. doi: 10.1016/j.jcv.2009.11.012 PMID: 20004146.
50. Aragão GC, Mascarenhas JDP, Kaiano JHL, de Lucena MSS, Siqueira JAM, et al. Norovirus diversity in diarrheic children from an African-descendant settlement in Belem,

Northern Brazil. *Plos One* (2013) 8(2): e56608. doi: 10.1371/journal.pone.0056608 PMID: 23457593.

51. Eden JS, Bull RA, Tu E, McIver CJ, Lyon MJ, Marshall JA, et al. Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008. *J Clin Virol* (2010) 49:265–271. doi: 10.1016/j.jcv.2010.09.001 PMID: 20888289.

52. Medici MC, Tummolo F, Martella V, Giammanco GM, De Grazia S, Arcangeletti MC, et al. Novel recombinant GII.P16_GII.13 and GII.P16_GII.3 norovirus strains in Italy. *Virus Res* (2014) 188:142–5. doi: 10.1016/j.virusres.2014.04.005 PMID: 24751799.

53. Lima AAM, Leite AM, Di Moura A, Lima NL, Soares AM, Abreu CB, et al. Determinant Variables, Enteric Pathogen Burden, Gut Function, and Immune-Related Inflammatory Biomarkers Associated with Childhood Malnutrition: A Prospective Case-Control Study in Northeastern Brazil. *Ped Infect Dis* (2017) Feb 22. doi: 10.1097/INF.0000000000001569 PMID: 28230705.

54. Li LL, Liu N, Humphries EM, Yu JM, Li S, Lindsay BR, et al. Aetiology of diarrhoeal disease and evaluation of viral-bacterial coinfection in children under 5 years old in China: a matched case-control study. *Clin Microbiol Infect.* (2016) Apr;22(4):381.e9-381.e16. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.018 PMID: 26724990.

55. Trang NV, Vu HT, Le NT, Huang P, Jiang X, Anh DD. Association between norovirus and rotavirus infection and histo–blood group antigen types in Vietnamese children. *J Clin Microbiol* (2014); 52: 1366–74. doi: 10.1128/JCM.02927-13 PMID: 24523471.

56. Coulson BS. Expanding diversity of glycan receptor usage by rotaviruses. *Curr Opin Virol* (2015); 15:90–6. doi: 10.1016/j.coviro.2015.08.012 PMID: 26363995.



Fig 1: Brazilian semi-arid region. Six cities of Northeast, Brazil located: Cajazeiras (Paraíba state), Crato (Ceará state), Ouricuri (Pernambuco state), Patos (Paraíba state), Picos (Piauí state) and Sousa (Paraíba state). Figure modified from National Water Agency (ANA) / Ministry of Integration from Brazil (MI).

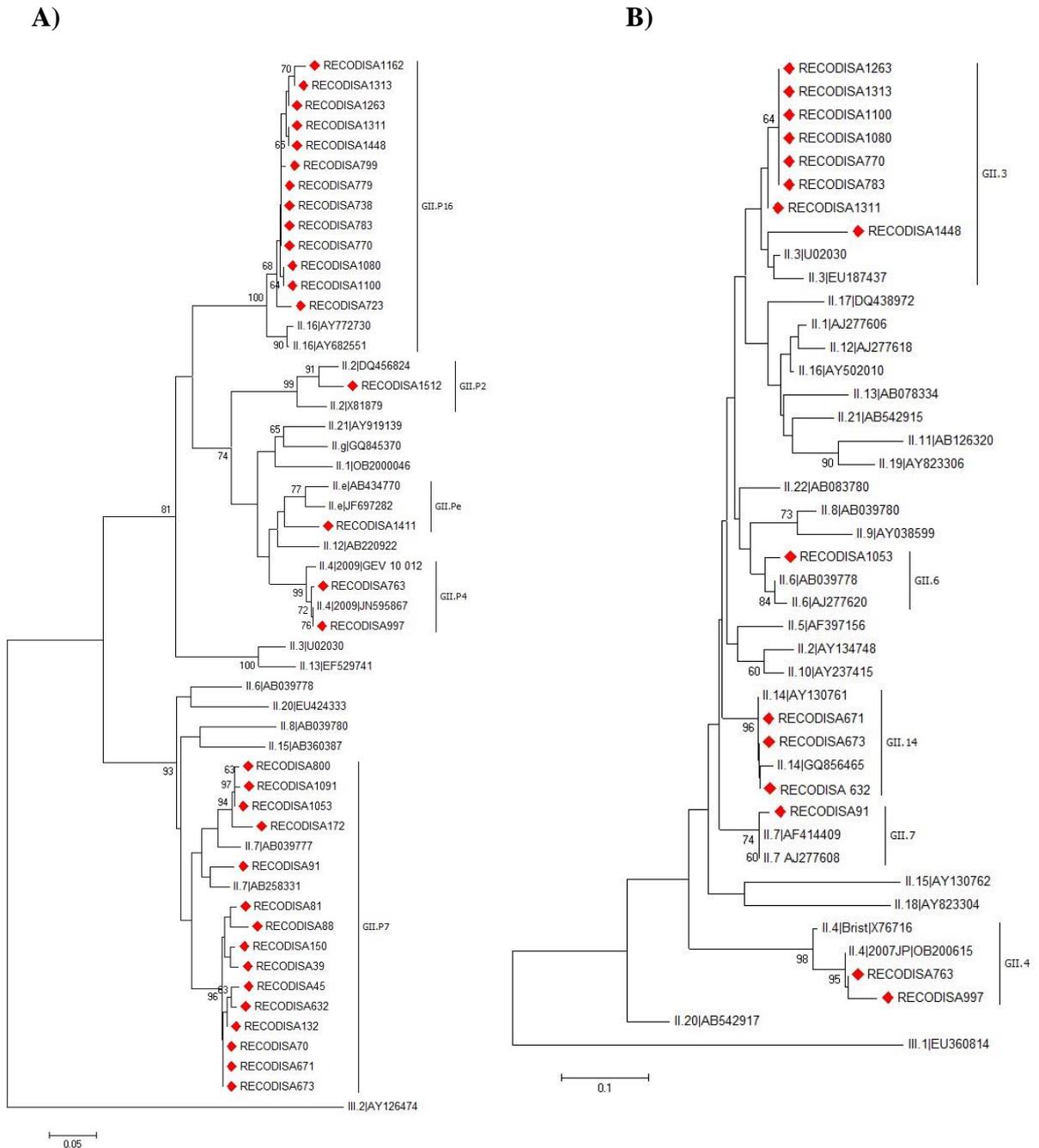


Fig 2: (A) Phylogenetic tree analysis based on a portion of the polymerase gene. (B) Phylogenetic tree analysis based on a portion of the capsid gene. Analysis was performed on 15 NoV genogroup II RNA obtained from children from Brazilian semi-arid region. Analysis was performed on 32 NoV genogroup II RNA obtained from children from Brazilian semiarid region. Samples of this study are marked with filled red diamonds. Bootstrap values expressed as percentages of 1000 replicates are provided above each branch nodes and values lower than 60% are not shown.

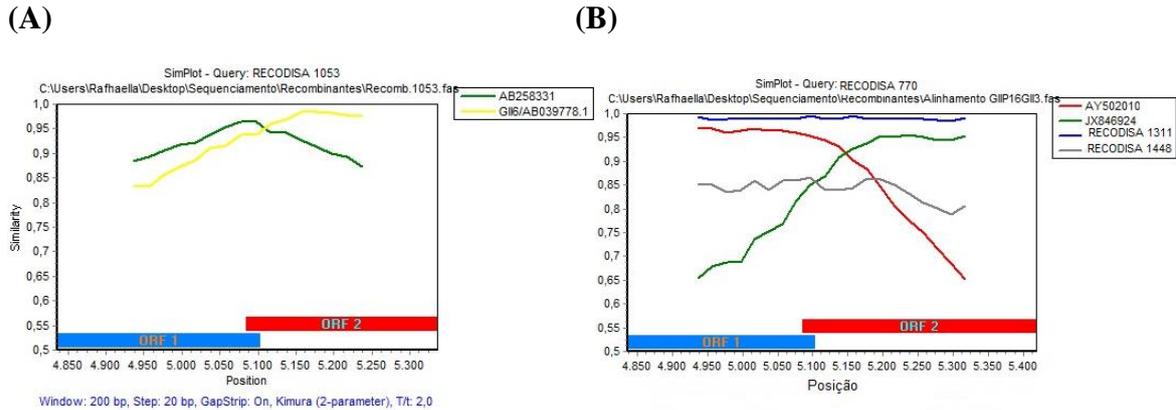


Fig 3: Simplot and Boostcan analyses of the recombinant Norovirus profiles detected NoV strains from children from Brazilian semiarid region. (A) GII6/GII3: study strains used were RECODISA 770 (Query); RECODISA 1311 (Blue line); RECODISA 1448 (Grey line) and reference strains AY502010 (Red line) and JX846924 (Green line). **(B) GII6/GII3:** study strain used was RECODISA 1053 (Query) and reference strains AB258331 (Green line); GI6/AB039778.1 (Yellow line). Vertical axis indicates nucleotide identities (%) between query sequences (Brazilian semiarid strains) and reference strains. NoV parental strains are indicated by their respectively Polymerase region-based genotypes (indicated by the letter P) or Capsid region-based genotypes.

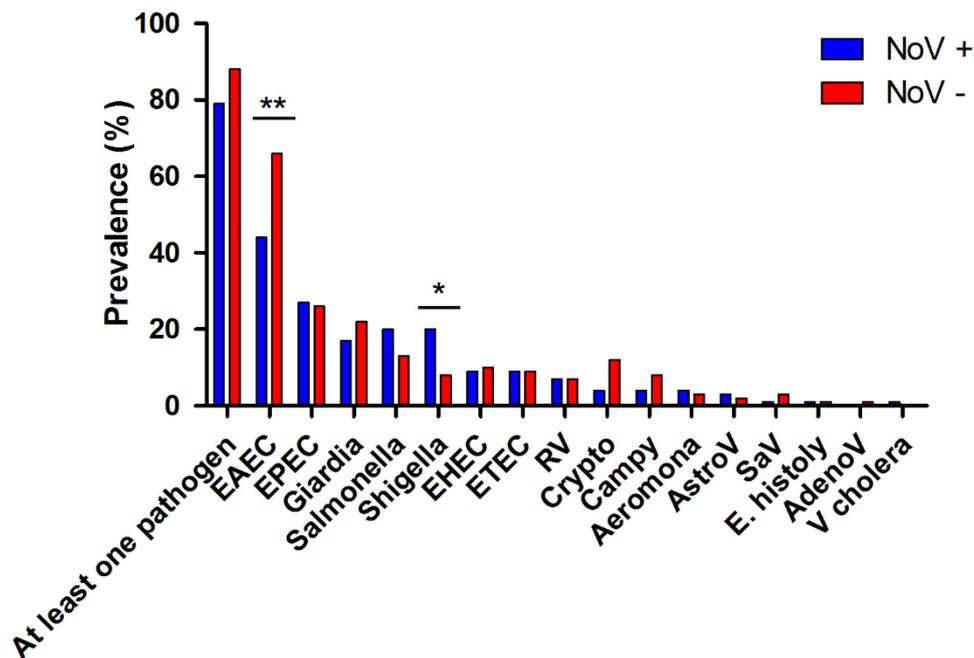


Fig 4: Pathogens detected in presence and absence NoV stools samples, 0–36 months. EAEC= enteroaggregative *Escherichia coli*; EPEC= enteropathogenic *E coli*; ETEC= enterotoxigenic *E coli*; EHEC= enterohemorrhagic *E. coli*; RV= Rotavirus; Crypto= *Cryptosporidium*; Campy= *Campylobacter* spp.; AstroV= Astrovirus; SaV= Sapovirus; E. histoly= *Entamoeba histolytic*; AdenoV= Adenovirus; V. cholera= *Vibrio cholera*. Pathogens present in less than 1% of stool samples are not shown. (**) P value= 0.0050 ODDR 2.463 IC 1.313 to 4.622 (*) P value= 0.0199 ODDR 3.0 IC 1.153 to 7.809. Fisher's exact test.

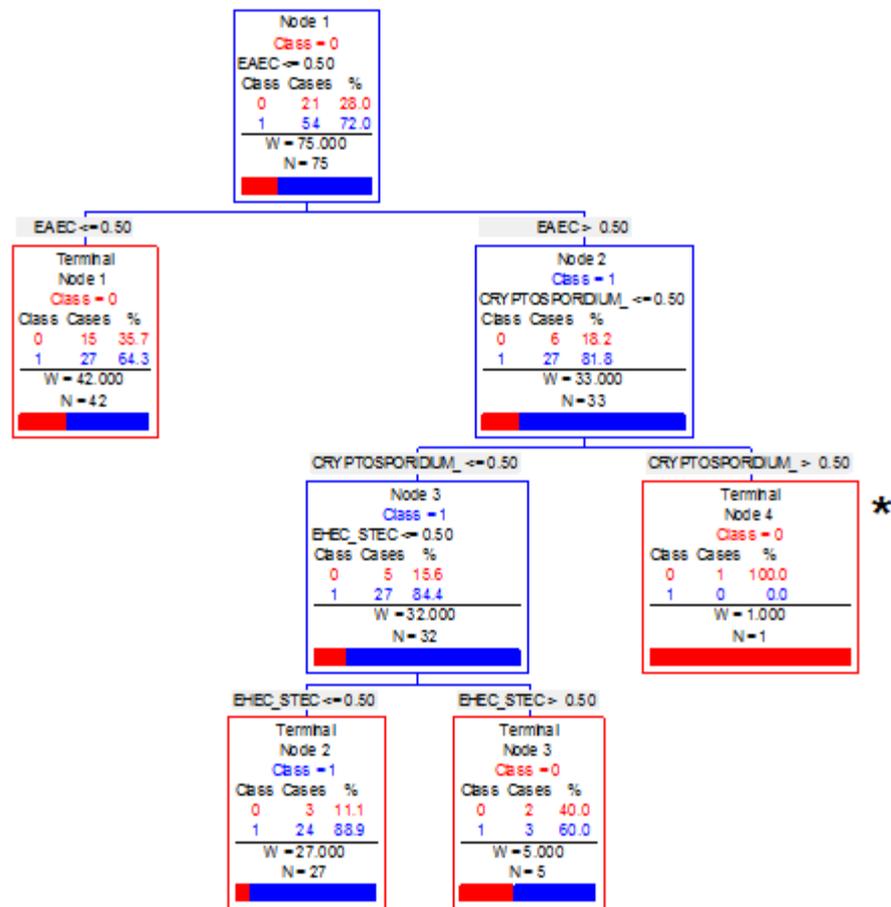


Fig 5: Classification and Regression Tree analysis of coinfections in positive Nov samples (n=75). The presence or absence of each pathogen between case and control groups is given inside each node. Terminal nodes are indicated by the red boxes. The tree is hierarchical in nature. * $P \geq 0.05$. Significant association between cases and presence of *EAEC* and absence of *Cryptosporidium* and *EHEC/STEC* pathogens (Terminal Node 2), * $P = 0.0167$, OR = 4.8.

Table 1: Characterization of children among cases and controls from Brazilian semiarid.

Parameters	Total n= 166	Case n= 117	Control n= 49	*P value
Sex				
Male (%)	87 (52.4%)	61 (52.1%)	26 (53%)	1.00
Age				
2 ≤ 12 m (%)	60 (36.1%)	41 (35%)	19 (38.7%)	0.723
> 12 ≤ 24 m (%)	68 (40.9%)	52 (44.4%)	16 (32.6%)	0.170
> 24 ≤ 36 m (%)	38 (23%)	24 (20.6%)	14 (28.7%)	0.311
Breastfeeding Status				
Exclusive breastfeeding (%)	11 (6.6%)	9 (7.7%)	2 (4%)	0.506
Mixed breastfeeding (%)	143 (86.1%)	98 (83.7%)	45 (92%)	0.221
No breastfeeding (%)	12 (7.2%)	10 (8.5%)	2 (4%)	0.512
Family monthly income (# of minimum wages)				
≤ 2	132 (79.5%)	95 (81.2%)	37 (75.5%)	0.407
2 ≤ 5	32 (19.3%)	21 (18%)	11 (22.4%)	0.522
No answer	2 (1.2%)	1 (0.8%)	1 (2.1%)	0.504

*P values obtained from Mann-Whitney and Fisher's exact tests (≥0.05 significant).

Table 2: Prevalence of NoV and its genogroups among case and control children from Brazilian semiarid.

	Case	Control	Total	*P value	
Norovirus positive	GI	5.5%(3/54)	4.7%(1/21)	2.4%(4/166)	1.0
	GII	94.4%(51/54)	95.2%(20/21)	42.7%(71/166)	0.86
	Total	46.1%(54/117)	42.8%(21/49)	45.2%(75/166)	0.73

*P value obtained after Fisher's exact test. Cases = children with diarrhea / Control = children without diarrhea. GI = genogroup I / GII = genogroup II

Table 3: Clinical characterization among positive and negative NoV samples from children from Brazilian semiarid.

Parameters	Total n= 166	NoV Positive n= 75	NoV Negative n= 91	*P value
Anthropometrics measures				
HAZ ¹ (mean ± SD)	-0.632 ± 1.535	-0.636 ± 1.372	-0.629 ± 1.665	0.798
WAZ ² (mean ± SD)	0.229 ± 1.198	0.015 ± 1.151	0.407 ± 1.214	0.034
WHZ ³ (mean ± SD)	0.802 ± 1.459	0.511 ± 1.426	1.044 ± 1.449	0.033
BAZ ⁴ (mean ± SD)	0.855 ± 1.535	0.546 ± 1.531	1.111 ± 1.498	0.033
Weight (kg; mean ± SD)	10.45 ± 2.658	10.15 ± 2.566	10.68 ± 2.729	0.238
Diarrhea				
Days of duration of diarrhea (Mean ± SD)	4.36 ± 2.461	4.02 ± 1.838	4.67 ± 2.885	0.156
Number of evacuations per day (Mean ± SD)	4.53 ± 1.029	4.52 ± 1.005	4.54 ± 1.058	0.511
Mucus in stool	10 (6%)	6 (8%)	4 (4.4%)	0.3498
Symptoms				
Fever (≥37.3 °C) (%)	48 (28.9%)	22 (29.3%)	26 (28.5%)	1.00
Abdominal pain (%)	21 (12.6%)	9 (12%)	12 (13.1%)	1.00
Vomiting (%)	40 (24%)	17 (22.6%)	23 (25.2%)	0.7193
Dehydration (%)	51 (30.7%)	18 (24%)	33 (36.2%)	0.0944
Respiratory Sympt (%)	26 (15.6%)	18 (24%)	8 (8.8%)	0.0096
Behavioral Signs				
Unquietly (%)	46 (27.7%)	19 (25.3%)	27 (29.6%)	0.6027
Weakness (%)	23 (13.8%)	12 (16%)	11 (12%)	0.5046

¹ Height-for-age z-scores (HAZ), ² weight-for-age z-scores (WAZ), ³ weight-for-height z score (WHZ) and ⁴ BMI-for-age z-scores (BAZ). Values with statistical significance are highlighted in bold. After T student test.