

Extração de RNA viral e detecção de calicivírus humanos (sapovírus e norovírus) por RT-PCR em amostras fecais provenientes de crianças menores de cinco anos de idade que frequentam Centros Municipais de Educação Infantil (CMEIS) em Goiânia-GO.

Hugo César Pereira Santos¹, Vítor Hugo Botacini Borges², Ana Maria Tavares Borges³,
Fabíola Souza Fiaccadori³, Menira Borges de Lima Dias e Souza⁴
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG, 74605050, Brasil
e-mail: hugocpsantos@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Calicivírus humanos, gastroenterite, norovírus.

1 INTRODUÇÃO

As gastroenterites agudas virais constituem importante causa de morbidade, principalmente em crianças menores de cinco anos em diversas partes do mundo, sendo importantes agentes etiológicos os rotavírus, calicivírus humanos (HuCVs), adenovírus entéricos e astrovírus, dentre outros (WILHELM et al., 2003). Os norovírus (NoVs) são a principal causa de gastroenterite epidêmica não-bacteriana, afetando indivíduos de todas as idades, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Considera-se que os NoVs sejam responsáveis por aproximadamente 50% de todos os surtos de gastroenterite no mundo e, que somente nos Estados Unidos, sejam responsáveis por 23 milhões de casos de gastroenterite e 50 mil hospitalizações a cada ano (MEAD et al., 1999; PATEL et al., 2008; 2009). Nos países em desenvolvimento, estudos têm reportado elevados índices de detecção de calicivírus humanos (norovírus e sapovírus) entre crianças menores de cinco anos (BINDHU et al., 2007; ARAGÃO et al., 2010; GARCIA et al., 2010).

Os NoVs foram observados pela primeira vez por microscopia eletrônica em um filtrado fecal proveniente de uma criança que apresentou gastroenterite durante um surto ocorrido em uma escola de ensino primário em Norwalk, Ohio, em 1972. Os sapovírus foram observados pela primeira vez em 1979, também por microscopia eletrônica, em amostras de crianças coletadas durante um surto de gastroenterite em um orfanato em Sapporo, no Japão (GREEN, 2007).

Revisado pela orientadora

1 – Orientando; 2 – Aluno de iniciação científica; 3 – Pesquisadoras colaboradoras;
4 - Orientadora

Os *norovirus* e *sapovirus* constituem gêneros distintos da família *Caliciviridae* (ICTV, 2009). As partículas virais são esféricas não envelopadas, possuem um diâmetro de 27 a 32 nm, e seu genoma é composto por RNA fita simples de polaridade positiva e compreende duas ou três regiões de leitura aberta (RLAs). A primeira RLA dos NoVs codifica para uma poliproteína, que é posteriormente clivada em várias proteínas não-estruturais. A segunda codifica para a proteína VP1 (formadora do capsídeo viral) e a terceira para VP2 (proteína menor estrutural). Para os sapovírus, a RLA1 codifica para uma poliproteína e a RLA2 para uma proteína pequena de constituição básica (GREEN, 2007).

Os NoVs são ainda classificados em genogrupos (GI-V), que são subdivididos em *clusters* genômicos. Amostras virais dos genogrupos GI, GII e GIV infectam humanos (ZHENG et al., 2006), sendo os NoVs do genogrupo I e II os mais prevalentes entre a população humana em geral. A classificação dos sapovírus também é feita em cinco genogrupos (GI-V), e somente amostras pertencentes ao genogrupo GIII não foram ainda detectadas em humanos (YIN et al., 2006). Estes agentes são, portanto, dotados de elevada diversidade genética e antigênica, o que têm dificultado o seu estudo, bem como a padronização dos métodos diagnósticos e de caracterização molecular (DONALDSON et al., 2008).

A principal via de transmissão dos HuCVs é a fecal-oral, e a infecção se dá principalmente, através da ingestão de água ou alimentos contaminados, exposição à fômites e contato pessoa-pessoa. Estudos têm mostrado que a infecção por calicivírus é autolimitada, com sintomas durando em média de 12 a 48 horas, sendo o período de incubação de 10 a 77 horas. Os principais sintomas associados à infecção são: náusea, vômito, diarreia e dor abdominal, relatos de cefaléia e mialgia também foram registrados. A desidratação devido à diarreia abundante é uma das complicações, principalmente em crianças e idosos (GREEN, 2007). Os NoVs têm sido também detectados em amostras fecais de crianças assintomáticas (BARREIRA et al., 2010).

Pessoas de todas as idades podem ser infectadas pelos HuCVs durante todas as estações do ano, podendo ocorrer picos sazonais no inverno e também verão nos países de clima temperado (MOUNTS et al., 2000). Os vírus do gênero *norovirus* são geralmente responsáveis por uma diarreia mais grave, enquanto que os *sapovirus* estão associados a uma diarreia mais branda (PANG et al., 2000; SAKAI et al., 2001). Os surtos de gastroenterites causados por esses vírus são mais frequentes em locais com aglomeração de pessoas como hospitais, creches, escolas, restaurantes e asilos, dentre outros (KOOPMANS, 2009).

Dados da literatura têm revelado que, em países desenvolvidos, a aquisição de anticorpos para os HuCVs é gradualmente crescente de acordo com o aumento da idade, de maneira que 50% dos indivíduos maiores de 50 anos possuem anticorpos contra esses vírus. Em contrapartida, estudos em países em desenvolvimento mostram que a soroprevalência de anticorpos contra o vírus *Norwalk* (GI-NoVs) pode variar de 80 a 100% em crianças de até cinco anos de idade (BLACK et al., 1982; DIMITROV et al., 1997). Apesar de grande parte da população mundial já ter sido infectada pelo menos uma vez por HuCVs, a imunidade a estes agentes não é muito bem compreendida, sendo que alguns estudos revelam a existência de imunidade heterotípica para certos genogrupos de curta duração, e uma imunidade homotípica de maior duração, mas não completamente protetora contra infecções subsequentes por estes vírus (LINDESMITH et al., 2003; 2005; DONALSON et al., 2010).

No contexto da importância das gastroenterites virais na infância, desde março de 2006, a Vacina Oral Humana para Rotavírus (Rotarix), constituída de uma cepa monovalente G1P[8] de rotavírus humano atenuado, vêm sendo utilizada no Brasil como parte do programa nacional de imunização, reforçando a necessidade de um contínuo monitoramento dos rotavírus humanos e de outros vírus gastroentéricos circulantes em diferentes grupos populacionais. Ademais, existe apenas um estudo epidemiológico conduzido na região Centro-Oeste, que detectou HuCV em 8,6% das amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda, coletadas no período de 1998 a 2002 (BORGES et al., 2006).

Considerando-se os índices significativos de detecção dos vírus gastroentéricos em crianças sintomáticas da região Centro-Oeste (CARDOSO et al., 2002; 2003; COSTA et al., 2004) e a escassez de estudos envolvendo a sua detecção em outros grupos populacionais, como crianças frequentadoras de creches, tornam-se necessários estudos complementares para se avaliar a ocorrência dos HuCVs, entre outros vírus, em crianças de até cinco anos de idade, com ou sem sintomas de gastroenterite, permitindo uma melhor avaliação da importância epidemiológica destes agentes em diferentes populações da região, bem como do possível papel dos assintomáticos na transmissão viral.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo detectar HuCVs em amostras fecais provenientes de crianças menores de cinco anos, frequentadoras de CMEIS em Goiânia-GO.

3 METODOLOGIA

3.1 Material de Estudo

O material de estudo foi constituído de 237 espécimes fecais, obtidas de igual número de crianças menores de cinco anos de idade, sintomáticas ou não, frequentadoras de oito diferentes CMEIs. As amostras foram coletadas no período de Janeiro de 2008 a Março de 2009, mediante assinatura do termo de consentimento em participação no estudo pelos pais ou responsáveis e acompanhadas de um questionário com perguntas para uma investigação clínica e epidemiológica.

O material, portanto, já havia sido coletado e encontrava-se armazenado *in natura* no Laboratório de Virologia Humana IPTSP/UFG, para a avaliação da ocorrência de HuCVs.

3.2 Preparo das Suspensões Fecais

As amostras fecais foram inicialmente processadas para a obtenção de uma suspensão fecal a 20% em tampão salina fosfato (PBS) pH 7,4. As suspensões foram homogeneizadas e clarificadas por centrifugação a 3000 x g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e estocado a -20°C até o momento de análise.

3.3 Extração do ssRNA para a detecção de HuCV

O RNA fita simples foi extraído a partir das suspensões fecais, utilizando-se o agente quiomiotrópico (isotiocianato de guanidina) e sílica, de acordo com descrição de BOOM et al. (1990), com modificações (CARDOSO et al., 2002), conforme descrito:

a. 300 µl de suspensão fecal de cada amostra foram incubados em banho-maria com 800 µl de tampão L6 e 20 µl de PK (10 mg/ml) por 10 minutos. Após essa fase, adicionaram-se 200 µl de etanol absoluto gelado e 15 µl de sílica, e homogeneizaram-se as amostras em vórtex.

b. A suspensão de cada amostra foi em seguida centrifugada a 16000 rotações por minuto por 20 segundos, descartando o sobrenadante. Essa etapa de centrifugação e descarte do sobrenadante foi repetida por três vezes, primeiramente adicionando-se 500 µl de tampão L2, seguido de 500 µl de etanol a 70% e, por último, 500 µl de acetona P.A.

c. Após a última centrifugação, o pellet foi colocado para secar em banho-maria por 15 minutos e depois foram adicionados 40 µl de água com DEPC 0,1% por amostra, seguido de nova incubação por mais 15 minutos. Homogeneizou-se então a suspensão, centrifugou-se a 16000 r.p.m por 3 minutos e recolheu-se 20 µl do sobrenadante em tubos eppendorff. O material extraído foi então armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.4 Detecção dos HuCVs por RT-PCR

A detecção de calicivírus foi feita por RT-PCR seguindo metodologia e iniciadores descritos por GREEN et al. (1995), VINJÉ et al. (1997) e JIANG et al. (1999).

Para amplificação de parte da RLA1, foi utilizado o par de iniciadores p289/290, com produto de tamanho esperado de 319 pb para os norovírus e 331 para os sapovírus. Para amplificação de segmento da RLA2, utilizou-se os iniciadores MON 381/383, com fragmento amplificado de tamanho esperado de 322pb para os NoVs. Os produtos de RT-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%) e visualizados em transluminador (UV) utilizando-se como padrão de tamanho molecular o 100pb DNA *ladder*.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

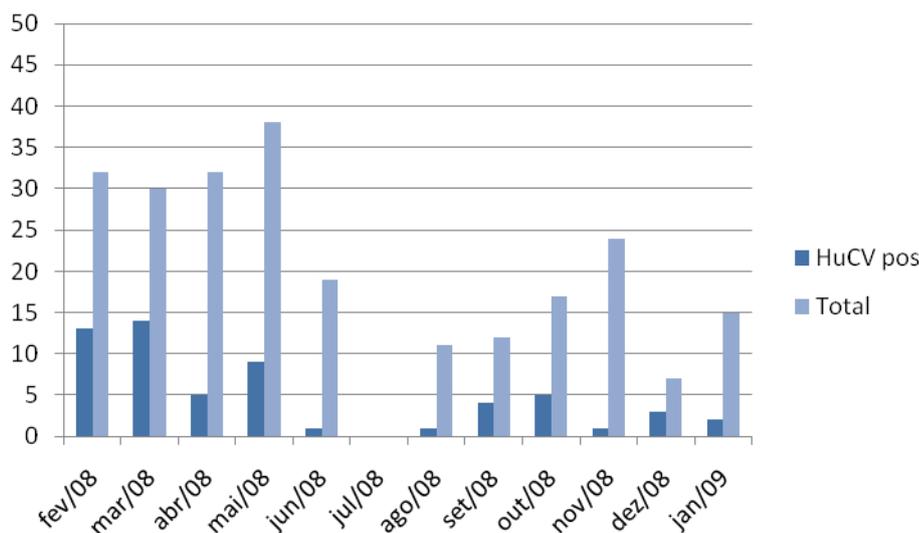
A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa EpInfo versão 6.0. Aplicou-se o teste de qui-quadrado (χ^2), com intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

Do total de 237 amostras fecais, 58 foram positivas para HuCVs, considerando-se a detecção pelos dois pares de iniciadores, perfazendo um índice global de positividade de 24,5%.

Em todos os CMEIs foram encontradas amostras positivas para calicivírus, bem como em todos os meses, durante o período do estudo. Entretanto, observaram-se maiores índices de detecção durante os meses com umidade relativa do ar mais alta (Gráfico 1).

Gráfico 1. Positividade para HuCVs em relação a cada mês de coleta das amostras fecais



Em nosso estudo, crianças do sexo masculino apresentaram maior índice de positividade do que crianças do sexo feminino (tabela 1). Entretanto, estes dados não foram estatisticamente significativos ($p=0,37$).

Tabela 1- Índices de positividade para calicivírus em amostras fecais de crianças frequentadoras de CMEIs, considerando o gênero das crianças.

	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Feminino	82 (34,6)	22 (9,3)	104 (43,9)
Masculino	97 (40,9)	36 (15,2)*	133 (56,1)
Total	179 (75,5)	58 (24,5)	237 (100,0)

* $\chi^2 = 0,81$, $p=0,37$

Quando consideramos a ocorrência dos HuCVs em relação a faixa etária das crianças observamos, em nosso estudo, a positividade para HuCVs em todas as faixas etárias, com maior ocorrência entre crianças com mais de 36 meses de idade ($p=0,004$) (tabela 2).

Tabela 2- Índices de positividade para calicivírus de acordo com a faixa etária das crianças.

Idade (meses)	Positivas/analizadas	%
0 – 12	3/37	8,1
13 – 24	34/121	28,1
25 – 36	6/40	15,0
>36*	15/39	38,46
Total	58/237	24,47

* $\chi^2 = 13,24$; $p = 0,004$

Nosso estudo envolveu crianças com ou sem quadro de gastroenterite, sendo encontrado um maior índice de positividade para calicivírus nas amostras não-diarréicas (tabela 3).

Tabela 3- Positividade para calicivírus em amostras fecais de crianças com ou sem diarreia.

Diarréia	Positivas/analizadas	%
Presente	14/72	19,4
Ausente	44/165*	26,7
Total	58/237	24,5

* $\chi^2= 1,05$, $p= 0,3$

5 DISCUSSÃO

O índice de positividade encontrado no presente trabalho foi semelhante aos reportados por outros estudos realizados no Brasil, que observaram taxas de detecção variando de 8,6 a 33,3% (BORGES et al., 2006; CASTILHO et al., 2006; VICTORIA et al., 2007). Entretanto, a maioria destes estudos teve como população alvo crianças com diarreia aguda, diferentemente do nosso estudo que teve como população alvo tanto crianças sintomáticas como assintomáticas.

Dentre as amostras positivas, 48 foram amplificadas com o par de iniciadores MON 381/383, demonstrando uma maior incidência de NoVs na população analisada, o que têm sido também relatado por outros autores em diferentes populações (DONALDSON et al., 2008; LINDESMITH et al., 2008).

Um estudo do Centro-Oeste (BORGES et al., 2006) observou uma sazonalidade para os HuCVs durante a estação chuvosa, corroborando os maiores índices de detecção durante os meses com umidade relativa do ar mais alta encontrado em nosso trabalho.

Em relação à faixa etária, diferentemente do observado no presente estudo, alguns estudos reportam a ocorrência tanto de sapovírus quanto de norovírus entre crianças de todas as faixas etárias (BORGES et al., 2006; BINDHU et al., 2007). Outros estudos revelam uma maior ocorrência de NoVs entre crianças com até 12 meses de idade (ARAGÃO et al., 2010), com maior risco para infecção assintomática entre menores de 6 meses de idade (BUCARDO et al., 2010).

A positividade para calicivírus em amostras não-diarréicas corrobora dados mundiais sobre a circulação dos HuCVs também entre indivíduos assintomáticos (O'RYAN et al. 2009; BARREIRA et al., 2010; BUCARDO et al., 2010).

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo demonstram a circulação de HuCVs, com destaque para os NoVs, tanto entre crianças sintomáticas quanto assintomáticas. Nossos resultados sugerem um possível envolvimento de crianças assintomáticas na transmissão dos HuCVs a susceptíveis, destacando a importância do monitoramento de diferentes populações, sintomáticas ou não, como medida de controle e prevenção de surtos epidêmicos, principalmente entre indivíduos que convivem em aglomeração ou em contato próximo. Estudos de caracterização molecular (sequenciamento genômico e análise filogenética) das amostras positivas para HuCVs estão em andamento em nosso laboratório para que o perfil epidemiológico destes agentes, na região, seja melhor compreendido.

REFERÊNCIAS

ARAGÃO, G. C.; OLIVEIRA, D. S.; SANTOS, M. C.; MASCARENHAS, J. D. P.; OLIVEIRA, C. S.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B. Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 1, p. 149-158, 2010.

BARREIRA, D. M. P. G.; FERREIRA, M. S. R.; FUMIAN, T. M.; CHECON, R.; SADOVSKY, A. D. I.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SPANO, L. C. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. **J Clin Virol**, v. 47, p. 60-64, 2010.

BINDHU, M.; SASIREKHA, R.; INDRANI, B.; BERYL, P.; MIREN, I-G.; GALLIMORE, I. C.; BROWN, D. W.; PRABHAKAR, F. M.; GRAY, J. J.; KANG, G. Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India. **J Med Virol**, v. 79, p. 544-551, 2007.

BLACK, R. E.; GREENBERG, H. B.; KAPIKIAN, A. Z.; BROWN, K. H.; BECKER, S. Acquisition of serum antibody to Norwalk Virus and rotavirus and relation to diarrhea in a longitudinal study of young children in rural Bangladesh. **J Infect Dis**, v. 145, p. 483-489, 1982.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-van DILLEN, P. M. E.; van der NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BORGES, A. M.; TEIXEIRA, J. M. S.; COSTA, P. S. S.; GIUGLIANO, L. G.; FIACCADORI, F. S.; FRANCO, R. C.; BRITO, W. M. E. D.; LEITE, J. P. G.; CARDOSO, D. D. P. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 721-724, 2006.

BUCARDO, F.; NORDGREN, J.; CARLSSON, B.; KINDBERG, E.; PANIAGUA, M.; MO, R.; SVENSSON, L. Asymptomatic norovirus infections in Nicaraguan children and its association with viral properties and histo-blood group antigens. **Pediatr Infect Dis J**, v. 29, p. 934-939, 2010.

CARDOSO, D. D. P.; FIACCADORI, F. S.; SOUZA, M. B. L. D.; MARTINS, R. M. B.; LEITE, J. P. G. Detection and genotyping of astroviruses from children with acute gastroenteritis from Goiânia, Goiás, Brazil. **Med Sci Monit**, v. 8, p. 624-628, 2002.

CARDOSO, D. D. P.; SOARES, C. M. A.; SOUZA, M. B. L. D.; AZEVEDO, M. S. P.; MARTINS, R. M. B.; QUEIRÓZ, D. A. O.; BRITO, W. M. E. D.; MUNFORD, V.; RÁCZ, M. L. Epidemiological features of Rotavirus infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n 1, p. 25-29, 2003.

CASTILHO, J. C.; MUNFORD, V.; RESQUE, H. R.; FAGUNDES-NETO, U.; VINJÉ, J.; RÁCZ, M. L. Genetic diversity of No among children with gastroenteritis in São Paulo state, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 3947-3953, 2006.

COSTA, S. S. P.; CARDOSO, D. D. P.; GRISI, S. J. F. E.; SILVA, P. A.; FIACCADORI, F.; SOUZA, M. B. L. D.; SANTOS, R. A. T. Infecções e reinfecções por *Rotavirus A*: genotipagem e implicações vacinais. **J Pediatría**, v. 80, n. 2, p. 119-122, 2004.

DIMITROV, D. H.; DASHTI, S. A.; BALL, J. M.; BISHBISHI, E.; ALSAEID, K.; JIANG, X.; ESTES, M. K. Prevalence of antibodies to human caliciviruses (HuCVs) in Kuwait established by ELISA using baculovirus-expressed capsid antigens representing two genogroups of HuCVs. **J Med Virol**, v. 51, p. 115-118, 1997.

DONALDSON, E. F.; LINDESMITH, L. C.; LOBUE, A. D.; BARIC, R. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. **Nature Reviews Microbiol**, v. 8, p. 231-241, 2010.

DONALDSON, E. F.; LINDESMITH, L. C.; LOBUE, A. D.; BARIC, R. No pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. **J compilat**, v. 225, p. 190-211, 2008.

GARCIA, C.; DUPONT, H. L.; LONG, K. Z.; SANTOS, J. I.; KO, G. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 1442-1448, 2010.

GREEN J.; GALLIMORE, C. I.; NORCOTT, J. P.; LEWIS, D.; BROWN, D. W. G. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV – associated gastroenteritis. **J Med Virol**, v. 47, p. 392-398, 1995.

GREEN, K. Y. *Caliciviridae*: the noroviruses. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. **Fields virology**. 15 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 949-979.

ICTV dB Manangement (2009). *Caliciviridae*. In: ICTVdB – **The Universal Virus Database, version 3**. Bünchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA 2010, International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

JIANG, X.; HUANG, P. W.; ZHONG, W. M.; FARKAS, T.; CUBITT, D. W.; MATSON, D. O. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk and Sapporo-like calicivirus by RT-PCR. **J Virol Methods**, v. 83, p. 145-154, 1999.

KOOPMANS, M. Norovirus in healthcare settings: a challenging problem. **J Hosp Infect**, v. 73, p. 331-337, 2009.

LINDESMITH, L. M.; DONALDSON, E. F.; LOBUE, A. D.; CANNON, J. L.; ZHENG, D. P.; VINJÉ, J.; BARIC, R. Mechanisms of GII. 4 no persistence in human populations. **Plos Medicine**, v. 5, p. 31, 2008.

LINDESMITH, L. M.; MOE, C.; LEPENDU, J.; FRELINGER, J. A.; TREANOR, J.; BARIC, R. S. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. **J Virol**, v. 79, p. 2900-2909, 2005.

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

MEAD, P. S.; SLUTSKER, P.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the united states reply to dr. hedberg. **Emerg Infect Dis**, v. 5, p. 841-842, 1999.

MOUNTS, A. W.; ANDO, T.; KOOPMANS, M.; BRESEE, J. S.; NOEL, J.; GLASS, R. I. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with norwalk-like viruses. **J Infect Dis**, v. 181, p. 284-287, 2000.

O'RYAN, M. L.; LUCERO, Y.; PRADO, V.; SANTOLAVA, M. E.; RABELLO, M.; SOLIS, Y.; BERRÍOS, D.; O'RYAN-SORIANO, M. A.; CORTÉS, H.; MAMANI, N. Symptomatic and asymptomatic rotavirus and norovirus infections during infancy in a Chilean birth cohort. **Pediatr Infect Dis J**, v. 28, p 879-884, 2009.

PANG, X.; HONMA, S.; NAKATA, S.; VESIKARI, T. Human calicivirus in acute gastroenteritis of young children in the community. **J Infect Dis**, Sapporo, v. 181, p. 288-294, 2000.

PATEL, M. M.; HALL, A. J.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U. D. Norovirus: a comprehensive review. **J Clin Virol**, v. 44, p. 1-8, 2009.

PATEL, M. M.; WIDDOWSON, M. A.; GLASS, R. L.; AKAZAWA, K.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U. D. Systematic literature review of role norovirus in sporadic gastroenteritis. **Emerg Infect Dis**, v.44, p. 1224-1231, 2008.

SAKAI, Y.; NAKATA, S.; HOMNA, S.; TATSUMI, M.; NUMATA-KINOSHITA, K.; CHIBA, S. Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. **Pediatr Infect Dis J**, Sapporo, v. 20, p. 849-853, set. 2001.

VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LEITE, J. P.; MIAGOSTOVICH, M. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. **Pediatr Infect Dis J**, Rio de Janeiro, v. 26, p. 602-606, jul. 2007.

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

WILHELMI, I.; ROMAN, E.; SANCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clin Microbiol Infect**, Madrid, v. 9, p. 247-262, 2003.

YIN, Y.; TOHYA, Y.; OGAWA, Y.; NUMAZAWA, D.; KATO, K.; AKASHI, H. Genetic analysis of calicivirus genomes detected in intestinal contents of piglets in Japan. **Arch Virol**, v. 151, p. 1749-1759, 2006.

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