
CALICIVÍRUS HUMANOS

*Ana Maria Tavares Borges*¹ e *Divina das Dores de Paula Cardoso*²

RESUMO

Os calicivírus humanos (HuCVs) têm sido descritos como importantes patógenos nas gastroenterites agudas em todo o mundo. Esses vírus pertencem à família *Caliciviridae*, que possui quatro gêneros, dentre os quais apenas *Norovirus* e *Sapovirus* infectam o homem. Possuem RNA de fita simples, de polaridade positiva e são poliadenilados na extremidade 3'. São desnudos, apresentam um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, têm diâmetro de 27-40 nm e uma arquitetura típica com cerca de 32 depressões em formato de cálice. Os HuCVs possuem uma grande diversidade genética, o que dificulta estudos de caracterização genômica. O conhecimento sobre a epidemiologia da infecção por calicivírus e a disponibilidade de métodos rápidos e eficazes de detecção desses vírus são importantes para as estratégias de prevenção e controle.

DESCRITORES: Calicivírus. Norovírus. Sapovírus.

HISTÓRICO

A primeira doença associada aos calicivírus humanos (HuCVs) foi descrita em 1929 por Zahorsky, que a denominou *winter vomiting disease*.

Na década de 1940, estudos realizados nos Estados Unidos mostraram que 75% dos casos de gastroenterite não eram associados a bactérias ou parasitas (Hodges et al. 1956). Pesquisas com voluntários foram então desenvolvidas, utilizando-se filtrados de amostras de fezes coletadas em surtos de gastroenterite, os quais não continham bactérias. Percebendo-se que esses filtrados produziam infecção, atribuiu-se aos vírus a responsabilidade pela síndrome (Gordon et al. 1947).

1 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical/Microbiologia. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG).

2 IPTSP, UFG.

Endereço para correspondência: Divina das Dores de Paula Cardoso. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG. Rua Delenda Rezende de Melo, s/n, esq. com a 1ª Avenida, Setor Universitário, CEP: 74605-050, Goiânia, Goiás. E-mail: dcardoso.ufg@gov.br

Recebido para publicação em 4/6/2004. Revisto em 10/3/2005. Aceito em 15/3/2005.

Em 1972, Kapikian et al. observaram, pela imunoeletromicroscopia (IEM), uma partícula viral de 27 nm, que foi relacionada com a doença ocorrida, em 1968, em uma escola em Norwalk, Ohio, semelhante à síndrome descrita por Zahorsky em 1929. Essa partícula foi denominada agente Norwalk. Em 1976, com base em casos de gastroenterite, outros vírus foram identificados por meio da imunomicroscopia eletrônica, sendo denominados *Sapporo-like virus* (SLV) e apontados como agentes infecciosos para o homem (Madeley e Cosgrove 1976).

CLASSIFICAÇÃO

Em razão de suas características genômicas, os HuCVs pertencem à família *Caliciviridae*. Essa família é composta por quatro gêneros: *Norovirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus* e *Vesivirus* (ICTV 2002). *Lagovirus* e *Vesivirus* são, até o momento, exclusivos de animais, enquanto *Norovirus* e *Sapovirus* infectam principalmente seres humanos. Embora, pela análise filogenética, todos os calicivírus apresentem um ancestral comum, esses vírus mostram grupos genômicos distintos dentro dos gêneros da família, considerando sobretudo características de organização do RNA genômico.

Ando et al. (2000) propuseram que o gênero, hoje denominado *Norovirus*, fosse classificado em três genogrupos: o genogrupo I é composto de cinco grupos genéticos; o genogrupo II, de nove grupos genéticos e o genogrupo III, de um único grupo genético. Os *Norovirus* comportam a espécie *Norwalk virus*, considerada vírus protótipo, e os isolados Desert Shield virus, Lordsdale virus, Mexico virus, Hawaii virus, Snow Mountain virus e Southampton virus. Os *Sapovirus* comportam a espécie protótipo *Sapporo virus* e os isolados Houston/86, Houston/90, London 29845, Manchester virus e Parkville virus (ICTV 2002).

Farkas et al. (2004), baseados na análise filogenética de 17 seqüências da região do capsídeo, sugerem a classificação do gênero *Sapovirus* em nove grupos genéticos dentro de cinco genogrupos:

- Genogrupo I/1 – Sapporo/82 como amostra protótipo, Houston/86, Plymouth/92, Manchester/93, Lyon 30388/98;
- Genogrupo I/2 – Parkville/94 como amostra protótipo e Houston/90;
- Genogrupo I/3 – Stockholm/97 e México 14917/00;
- Genogrupo II/1 – London/92, Lyon 598/97 e Bristol/98;
- Genogrupo II/2 – México 340/90;
- Genogrupo II/3 – Cruise ship/00;
- Genogrupo III – PEC/Cowden (origem animal);
- Genogrupo IV – Houston 7-1181/90;
- Genogrupo V – Argentina 39.

ESTRUTURA MORFOLÓGICA

Os calicivírus são vírus esféricos, pequenos, com um diâmetro de 27 a 40 nm, não envelopados e com uma densidade de sedimentação em CsCl de 1,33 a 1,41

g/cm³. Seu capsídeo é composto por um único tipo de proteína, a qual exibe uma simetria icosaédrica com 180 moléculas organizadas em 90 dímeros, que formam dois domínios: o domínio S e o domínio P. O domínio S forma a parte interna do capsídeo que envolve o genoma RNA; o domínio P, subdividido nos domínios P1 e P2, assume, por intermédio deles, uma arquitetura característica: é visto em forma de cálice pela microscopia eletrônica (ME). Essa arquitetura é mais aparente nos *Sapovirus*, conferindo-lhes a aparência de estrela-de-davi (Atmar e Estes 2001; Green et al. 2000).

CARACTERÍSTICAS GENÔMICAS E ANTIGÊNICAS

Os calicivírus possuem um genoma de RNA de fita simples, de polaridade positiva, com um tamanho que varia de 7,3 a 8,3 Kb. Apresentam também uma proteína viral ligada ao terminal 5' do RNA, a VPg e uma cauda Poli A. A VPg tem um papel essencial na infectividade viral e na tradução inicial. As proteínas não estruturais são codificadas no terminal 5' e as estruturais, no terminal 3' do genoma (Guo et al. 2001; Jiang et al. 1993; Meyers 2003).

A organização genômica dos calicivírus difere entre os gêneros da família. Nos membros dos gêneros *Norovirus* e *Vesivirus*, o genoma é organizado em três regiões de leitura aberta (RLA 1, RLA 2 e RLA 3), e a proteína estrutural do capsídeo é codificada na RLA2, uma região separada da poliproteína não estrutural. O genoma dos *Sapovirus* e *Lagovirus* é organizado em apenas duas regiões de leitura aberta (RLA 1 e RLA 2); a poliproteína não estrutural e a proteína do capsídeo são codificadas em uma mesma região de leitura aberta, na RLA1 (Green et al. 2000; Koopmans et al. 2002).

Nos *Norovirus*, a RLA 1 codifica para uma poliproteína que, por clivagem, gera três proteínas, a 2C, a 3C e a 3D, as quais contêm motivos para helicase, cisteína protease e RNA polimerase RNA-dependente, respectivamente. A RLA 2 codifica para um único tipo de proteína do capsídeo, de 58 a 80 KDa. Essa proteína parece ter também um papel importante na replicação e montagem do vírus. A RLA3, considerada a região mais variável do genoma, codifica para uma pequena proteína estrutural que varia de 10 a 30 KDa e, possivelmente, tem as funções de encapsidação do RNA viral e de regulação da montagem do vírus (Glass et al. 2000; Jiang et al. 1993).

Os sapovírus humanos, com exceção do London/92, contêm uma RLA com sobreposição no terminal 5' do gene do capsídeo, que não é encontrado no genoma dos norovírus. A presença de um motivo conservado de iniciação para tradução GCAAUGG no final 5' dessa RLA sugere a possibilidade de codificação de uma proteína funcional nessa região (Farkas et al. 2004).

EPIDEMIOLOGIA

Os HuCVs infectam indivíduos de todas as faixas etárias, distinguindo-se, dessa maneira, de outros agentes virais de gastroenterite, como os rotavírus, os

astrovírus e os adenovírus, que infectam, preferencialmente, crianças de até 5 anos de idade (Glass et al. 2000). Os vírus do gênero *Norovirus* freqüentemente causam surtos de gastroenterite associados à água e a alimentos contaminados, provocando diarreia severa; enquanto os vírus do gênero *Sapovirus*, que infectam principalmente crianças, são geralmente associados à diarreia branda, não se excluindo alguns casos severos (Pang et al. 2000; Sakai et al. 2001).

Estudos de soroprevalência têm fornecido informações sobre a epidemiologia desses vírus e identificado os principais grupos de risco para a infecção. Esses estudos indicam que a aquisição de anticorpos para os HuCVs aumenta com a idade, alcançando índices de 50% a 90% entre adultos em diferentes países do mundo. Nos países em desenvolvimento, essa aquisição ocorre mais precocemente (Cubitt et al. 1994; Honma et al. 1998; Lew et al. 1994; Nakata et al. 1998; O’Ryan et al. 1998).

Não se tem observado uma correlação absoluta entre a alta prevalência de anticorpos para norovírus ou sapovírus e o alto índice de detecção viral (Honma et al. 1998; Nakata et al. 1998). Algumas explicações, no entanto, são apontadas: 1) a possibilidade de uma doença autolimitada que não exija visita médica; 2) a não-solicitação de exames para pesquisa viral por parte dos profissionais médicos; 3) a indisponibilidade de métodos diagnósticos práticos para a detecção viral (Nakata et al. 2000).

Observa-se que a aquisição de anticorpos para HuCV ocorre indiferentemente em casos de doença sintomática e não sintomática. Nota-se ainda que, nas infecções sintomáticas em crianças, num percentual de 40% a 50%, os agentes predominantes pertencem ao genogruppo II dos *Norovirus* (Pang et al. 1999), embora no Japão tenha sido observada prevalência semelhante para ambos os gêneros (Nakata et al. 2000).

Nos Estados Unidos, Frankhauser et al. (1998), realizando pesquisas em 33 estados, definiram as características epidemiológicas de 90 surtos de gastroenterites não bacterianas em diferentes ambientes. De acordo com os autores, os surtos eram mais comuns em asilos (43%) e restaurantes (26%). A transmissão se deu principalmente por meio de alimentos (37%), contato pessoal (20%), consumo de ostras (10%) e pela água (6%). Esses achados são semelhantes aos obtidos em outras regiões do mundo (Dedman et al. 1998; Hedlund et al. 2000; Wright et al. 1998).

A infecção por HuCVs tem sido observada durante todos os meses do ano, porém com maior circulação dos vírus no inverno. Em virtude da rapidez em que são disseminados na população e da predominância de sua transmissão nos meses frios, acredita-se que esses vírus sejam transmitidos pelo ar, caracterizando uma suposta rota secundária de transmissão (Mounts et al. 2000; Sawyer et al. 1988).

PATOGÊNESE , PATOLOGIA E QUADRO CLÍNICO

Os calicivírus penetram no organismo humano predominantemente pela via oral. A ingestão de água e alimentos contaminados é a forma mais comum de

contaminação por esses vírus, mas ela pode ocorrer também mediante o contato pessoal ou mesmo por aerossóis produzidos durante o vômito (Koopmans et al. 2002; Marks et al. 2000; Sair et al. 2002). Os HuCVs são considerados resistentes a pH ácido, já que permanecem infecciosos após a passagem pelo estômago (Caul 1996; Dolin et al. 1972).

Estudos realizados em voluntários humanos vêm mostrando que a infecção por HuCVs é autolimitada e tem um período de duração médio de 24 a 48 horas, que é precedido de um período de incubação semelhante. Esses vírus são excretados nas fezes em baixas concentrações (dose infecciosa de 10-100 vírions), e sua excreção tem início 15 horas após a inoculação, com um pico de 25 a 72 horas (Kaplan et al. 1982a,b; Parashar et al. 1998).

O sítio primário de replicação dos calicivírus no homem não é bem conhecido, mas admite-se ser a porção jejunal do intestino delgado, onde ocorre desorganização das células epiteliais, achatamento das vilosidades intestinais, vacuolização do citoplasma e infiltração da lâmina própria por células mononucleares (Agus et al. 1973; Dolin et al. 1975; Schreiber et al. 1973).

A doença é caracterizada por náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia e cefaléia. Embora esses sintomas sejam vistos em pacientes de todas as faixas etárias, o vômito é mais freqüente entre as crianças e a diarreia, entre adultos (Adler e Zickl 1969; Chris 2003; Cubitt et al. 1979; Dolin et al. 1971, Kaplan et al. 1982a; Meeroff et al. 1980; Parrino et al. 1977).

IMUNIDADE

Os calicivírus induzem uma imunidade fugaz (Wyn-Jones et al. 2000). Os estudos de reinfecção por um mesmo inóculo sugerem uma imunidade de 6 a 14 semanas (Dolin et al. 1972).

Evidências de fatores não imunológicos relacionados com a resistência à infecção por norovírus foram obtidas de estudos realizados em voluntários, nos quais foram determinados os níveis de anticorpos no soro e no jejuno de indivíduos infectados. A média geométrica de títulos de anticorpos no soro ou no fluido jejunal não foi correlacionada com resistência à doença. Ao contrário, nos indivíduos que desenvolveram a doença, a média de títulos de anticorpos, tanto no fluido jejunal quanto no soro, era bem mais alta que nos indivíduos que não se tornaram doentes. Uma das hipóteses levantadas é a existência, no trato intestinal, de alguma variação genética determinada pelos receptores virais que confere uma resistência de longa duração na ausência de anticorpos (Baron et al. 1984; Greenberg et al. 1978).

A imunidade para sapovírus é menos conhecida, mas acredita-se que haja uma correlação dos anticorpos com a resistência à infecção em crianças (Farkas et al. 2004).

DIAGNÓSTICO

Diferentes procedimentos têm sido adotados na tentativa da identificação de HuCVs. Esses vírus são considerados de difícil cultivo e, até o momento, não se tem animal de experimentação para eles. O diagnóstico laboratorial hoje em uso compreende tanto ensaios moleculares quanto não moleculares. Dentre os ensaios não moleculares, tem-se a visualização das partículas virais pela microscopia eletrônica (ME), de utilidade um pouco limitada em razão da baixa concentração de vírus nas fezes ($10^5 - 10^6$ partículas por ml em suspensão), o que dificulta sua visualização (Koopmans et al. 2002). Utiliza-se também a IEM, pois, além de aumentar a sensibilidade de detecção, permite a identificação do vírus com a utilização de soro padrão específico. Algumas modificações deste método, como a imunomicroscopia de fase sólida (SPIEM), também vêm sendo empregadas para a detecção desses vírus (Atmar e Estes 2001). As técnicas de IEM e SPIEM são preferíveis à ME, em razão das limitações, já referidas, apresentadas por essa última (Kapikian et al. 1972). A IEM pode ser usada também na detecção de anticorpos, constituindo um método específico e reproduzível, porém trabalhoso e cuja execução consome muito tempo (Atmar e Estes 2001).

O ensaio de hemaglutinação por imunoaderência (IAHA) foi desenvolvido para avaliar o nível de anticorpos em soros em estudo de soroprevalência. Entretanto, apesar de ser sensível e específico e de requerer pequena quantidade de antígenos, é um ensaio ineficiente para detecção de antígeno nas fezes; primeiro, por exigir antígeno parcialmente purificado e segundo, em razão da existência de hemaglutininas não específicas nos HuCVs. Dessa forma, vem-se substituindo o IAHA pelo radioensaio (RIA), que é um método mais sensível e exige menor quantidade de antígeno. Desenvolvido como uma alternativa à IEM para detecção de antígeno nas fezes, o RIA detecta partículas e antígeno solúvel para Norwalk (Greenberg e Kapikian 1978; Greenberg et al. 1978).

O ensaio imunoenzimático (EIA), usado na detecção de antígeno para *Norwalk virus* em amostras de fezes, é um ensaio com sensibilidade similar à do RIA, tendo ainda as vantagens da maior estabilidade dos reagentes utilizados e da não-utilização de radioisótopos. Em virtude da grande diversidade genética e antigênica dos *Norwalk virus*, vêm se empregando os testes de ELISA, baseados em capsídeos recombinantes ou na utilização de soros hiperimunes e mesmo de anticorpos monoclonais. Esses testes, no entanto, possuem uma limitação: não detectam infecções causadas por calicivírus distantemente relacionados (Guo et al. 2001). Embora o ELISA possa significar uma alternativa para estudos de surtos de gastroenterite, por ser uma metodologia rápida e de fácil execução, outras metodologias, como a reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR) ou a ME, são necessárias para a análise de amostras negativas (Richards et al. 2003).

Na década de 1990, com a disponibilidade das técnicas moleculares para amplificar, seqüenciar e expressar genomas, obteve-se a caracterização genética e antigênica dos HuCVs. O ensaio de hibridização e a RT-PCR têm sido os métodos mais utilizados para detecção de genoma de calicivírus em amostras clínicas e ambientais. O completo seqüenciamento de alguns HuCVs vem permitindo o desenvolvimento de pares de iniciadores específicos para genogrupos individuais e a tipagem molecular das amostras. Em comparação com a ME, a RT-PCR é um método mais eficaz na detecção viral se considerada a pequena quantidade de material viral no espécime, bem como a duração mais longa do período de detecção pós-infecção (Parashar et al. 1998; Yamazaki et al. 1996).

Os pares de iniciadores mais utilizados na RT-PCR são aqueles desenhados com base no gene para RNA polimerase viral, uma vez que essa é uma região conservada do genoma dos calicivírus (Ando et al. 1995; Green et al. 1995; Jiang et al. 1999). Outras regiões do genoma, como as que codificam para o capsídeo viral e para a helicase, ou mesmo a região da ORF3, podem também ser utilizadas para desenho dos iniciadores específicos (Vainio et al. 2001). O uso da RT-PCR e o seqüenciamento genômico têm revelado a extrema diversidade dos calicivírus e a dificuldade em desenvolver um sistema de detecção que englobe todos eles. Portanto, é aconselhável utilizar múltiplas áreas do genoma como alvo para os iniciadores, o que amplia a chance de detecção viral (Atmar e Estes 2001; Green et al. 1995).

Outro modo utilizado para a identificação de ácido nucléico é o ensaio de mobilidade heterodúplex (HMA), que, sendo mais rápido e menos oneroso, pode ser uma alternativa para o seqüenciamento (Mattick et al. 2000).

ABSTRACT

Human caliciviruses

Human caliciviruses (HuCVs) have been worldwide described as important pathogens in the acute gastroenteritis. These viruses belong to the *Caliciviridae* family that has four described genera *Norovirus* and *Sapovirus* being the only ones that infect humans. They have a single strand of RNA of positive polarity and polyadenylated in the 3' extremity. They present a nucleocapsid of icosahedral symmetry of 27-40 nm of diameter and a typical architecture with 32 cup-shaped depressions. The HuCVs have a great genetic diversity making difficult the studies of genomic characterization. The knowledge of the epidemiology of the caliciviruses infection and the availability of efficient and fast methods of detection of these viruses are important for strategies of prevention and control.

KEYWORDS: Calicivirus. Norovirus. Sapovirus.

REFERÊNCIAS

1. Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 119: 668-673, 1969.
2. Agus SG, Dolin R, Wyatt RG, Tousimis AJ, Northrup RS. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: intestinal histopathology. *Ann Inter Med* 79: 18-25, 1973.
3. Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC, Glass RI. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J Clin Microbiol* 33: 64-71, 1995.
4. Ando T, Noel JS, Frankhauser RL. Genetic classification of “Norwalk-like viruses”. *J Infect Dis* 181: S336-348, 2000.
5. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of Noncultivable Gastroenteritis Viruses, The Human Caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 14: 15-37, 2001.
6. Baron RC, Greenberg HB, Cukor G, Blacklow NR. Serological responses among teenagers after natural exposure to Norwalk virus. *J Infect Dis* 150: 531-534, 1984.
7. Caul EO. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part I. The clinical and diagnostic perspective. *J Clin Pathol* 49: 874-880, 1996.
8. Chris, Allison. Norwalk-like viruses: When the runs can slow you down. *CMAJ* 168: 64-65, 2003.
9. Cubitt WD, Mswiggan DA, Moore W. Winter vomiting disease caused by calicivirus. *J Clin Pathol* 32: 786-793, 1979.
10. Cubitt WD, Jlang XJ, Wang J, Estes MK. Sequence similarity of human caliciviruses and small round structured viruses. *J Med Virol* 43: 252-258, 1994.
11. Dedman D Laurichesse H, Caul EO, Wall PG. Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales, 1990-5. *Epidemiol Infect* 121: 139-49, 1998.
12. Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Formal S, Buscho RF, Kasel JA, Chames RP, Hornick R, & Chanock RM. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis* 123: 307-312, 1971.
13. Dolin R, Blacklow NR, DuPont H. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 140: 578-583, 1972.
14. Dolin R, Levy AG, Wyatt RG, Thornhill TS, Gardner JD. Viral gastroenteritis induced by the Hawaii agent: jejunal histopathology and serologic response. *Am J Med* 59: 761-767, 1975.
15. Farkas T, Zhong WM, Jing J, Huang PW, Espinosa SM, Martinez N, Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK, Jiang X. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol*, 2004. Published online: 17 march, 2004. Acesso em 13/04/2004.
16. Frankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T & Glass RI. Molecular Epidemiology of “Norwalk-like Viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 178: 1571-1578, 1998.
17. Glass RI, Noel J, Ando T, Frankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee J, Monroe S. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: A reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis*, 181: S254-261, 2000.
18. Glass PJ, White LJ, Ball JM, Lepare-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 74: 6581-6591, 2000.
19. Gordon I, Ingraham HS, Korns RF. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal isolates. *J Exp Med* 86: 409-422, 1947.
20. Green J, Gallimore CI, Norcott JP, Lewis D, Brown DWG. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV – associated gastroenteritis. *J Med Virol* 47: 392-398, 1995.
21. Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neil JD, Studdert MJ, Thiel HJ. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis*, 181: S322-330, 2000.
22. Greenberg HB, Kapikian AZ. Detection of Norwalk agent antibody and antigen by solid-phase radioimmunoassay and immune adherence hemagglutination assay. *JAVMA* 173: 620-623, 1978.
23. Greenberg HB. Solid-phase microtiter radioimmunoassay for detection of Norwalk strain of acute nonbacterial, epidemic gastroenteritis virus and its antibodies. *J Med Viro*, 2: 97-108, 1978.

24. Guo M, Qian Y, Chang K, Saif LJ. Expression and self-assembly in Baculovirus of porcine enteric calicivirus capsids into virus-like particles and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for antibody detection in swine. *J Clin Microb* 39: 1487-1493, 2001.
25. Hedlung KO, Rubilar-Abreu E, Svensson L. Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994-1998. *J Infect Dis* 181: S275-280, 2000.
26. Hodges RG, Maccorkle LP, Badger GF, Curtis C, Dingle JH, Jordan WS. A study of illness in a group of Cleveland families: XI. The occurrence of gastrointestinal symptoms. *Am J Hyg* 64: 349-356, 1956.
27. Honma S, Nakata S, Numata K, Kogawa K, Yamashita T, Oseto M, Jiang X, Chiba S. Epidemiological Study of Prevalence of genogroup II Human Calicivirus (Mexico Virus) infections in Japan and Southeast Asia as determined by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microb* 36: 2481-2484, 1998.
28. ICTVdB. Index of Viruses. Disponível em: www.ncbi.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_calic.htm. Acesso em: 16 de julho de 2003.
29. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk vírus. *Virology* 195: 51-61, 1993.
30. Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Aand Matson DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk and Sapporo-like calicivirus by RT-PCR. *J Virol Meth* 83: 145-154, 1999.
31. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR. & Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infections nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10: 1075-1081, 1972.
32. Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, Singh N, Schonberger LB, Feldman R, Greenberg HB. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute gastroenteritis. *Ann Inter Med* 96: 756-761, 1982 a.
33. Kaplan JE, Feldman R, Campbell D, Lookabaugh C, Gary W. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am J Public Health* 72: 1329-1332, 1982 b.
34. Koopmans M, Bonsdorff CH, Vinjé J, Medici D, Monroe S. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Reviews* 26: 187-205, 2002.
35. Lew JF, Kapikian AZ, Valdesuso J, Gren KY. Molecular characterization of Hawaii vírus and other Norwalk-like víruses: evidence for genetic polymorphism among human caliciviruses. *J Infect Dis* 170: 535-542, 1994.
36. Madeley CR, Cosgrove BP. Letter: calicivirus in man. *Lancet* i: 199-200. 1976.
37. Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin F, Fey RE, Caul EO. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like vírus (NVL) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect* 124: 481-487, 2000.
38. Mattick KL, Green J, Punia P, Belda FJ, Gallimore CI, Brown DWG. The heteroduplex mobility assay (HMA) as a pre-sequencing screen for Norwalk-like víruses. *J Virol Meth*, 87: 161-169, 2000.
39. Meeroff JC, Schreiber DS, Trier JS, Blacklow NR. Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. *Ann Inter Med* 92: 370-373, 1980.
40. Meyers G. Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *J Biol Chem* 278: 34051-34060, 2003.
41. Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like víruses. *J Infect Dis* 181: S284-287, 2000.
42. Nakata S, Honma S, Numata K, Kogawa K, Ukae S, Morita Y, Adachi N, Chiba S. Members of the family Caliciviridae (Norwalk vírus and Sapporo vírus) are the most prevalent cause of gastroenteritis outbreaks among infants in Japan. *J Infect Dis* 181: 2029-2032, 2000.
43. Nakata S, Honma S, Numata K, Kogawa K, Ukae S, Adachi N, Jiang X, Estes MK, Gatherer Z, Tukei PM, Chiba S. Prevalence of human calicivirus infections in Kenya as determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the vírus. *J Clin Microbiol* 36: 3160-3163, 1998.
44. O'ryan ML, Vial PA, Mamani N, Jiang X, Estes MK, Ferrecio C, Lakkis H, Matson D. Seroprevalence of Norwalk vírus and Mexico vírus in Chilean individuals: Assessment of independent risk factors for antibody acquisition. *Clin Infect Dis* 27: 789-795, 1998.

45. Pang X, Joensuu J, Vesikari T. Human calicivirus-associated sporadic gastroenteritis in Finnish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Pediatr Infect Dis J* 18: 420-426, 1999.
46. Pang X, Honma S, Nakata S, Vesikari T. Human calicivirus in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis* 181: S288-294, 2000.
47. Parashar UD, Dow L, Frankhauser RL, Humprey CD, Miller J, Ando T, Williams KS, Eddy CR, Noel JS, Ingram T, Bresee JS, Monroe SS, Glass RI. An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwich: implications for the control transmission by food handlers. *Epidemiol Infect* 121: 615-621, 1998.
48. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 297: 86-89, 1977.
49. Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, Cotterill H, Ratcliffe S, Jenkins M, Appleton H, Gallimore CI, Gray JJ, Brown DWG. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol* 26: 109-115, 2003.
50. Sair AI, D'souza DH, Moe CL, Jaykus L. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *J Virol Meth* 100: 57-69, 2002.
51. Sakai Y, Nakata S, Honma 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* 20: 849-853, 2001.
52. Sawyer LA, Murphy JJ, Kaplan JE, Pinsky PF, Chacon D, Walmsley S, Schonberger LB, Phillips A, Forward K, Goldman C. et al. 25- to 30-nm virus particle associated with a hospital outbreak of acute gastroenteritis with evidence for airborne transmission. *Am J Epidemiol* 127: 1261-1271, 1998.
53. Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med* 288: 1318-1323, 1973.
54. Vainio K, Stene-Johansen K, Jonassen TO, Bruu A, Grinde B. Molecular epidemiology of calicivirus infections in Norway. *J Med Virol* 65: 309-314, 2001.
55. Wright PJ, Gunesekere IC, Doultree JC, Marshall JA. Small round-structured (Norwalk-like) viruses and classical human caliciviruses in southeastern Australia, 1980-1996. *J Med Virol* 55:312-320, 1998.
56. Wyn-Jones AP, Pallin R, Dedoussis C, Shore J, Sellwood J. The detection of small round-structured viruses in water and environmental materials. *J Virol Meth* 87: 99-107, 2000.
57. Yamazaki K, Oseto M, Seto Y, Utagawa E, Kimoto T, Minekawa Y, Inouye S, Yamazaki S, Okudo Y, Oishi I. Reverse transcription-polymerase chain reaction detection and sequence analysis of small round-structured viruses in Japan. *Arch Virol* 12: 271-176, 1996.