

Investigação Molecular da Infecção Pelo Norovírus em Filhotes de Cães Domésticos de Cuiabá, Mato Grosso

Molecular Investigation of the Norovirus Infection in Puppies from Cuiaba, Mato Grosso State

Gabriela Molinari Darold^a; Ana Helena Benetti-Gomes^a; Alexandre Mendes Amude^a; Raphael Rogger Vieira^a; Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho^b; Michele Lunardi^{*c}

^aUniversidade de Cuiabá, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociência Animal. MT, Brasil

^bUnopar, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Saúde e Produção Animal. PR, Brasil

^cUniversidade Estadual de Londrina, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal. PR, Brasil.

*E-mail: michelelunardi@gmail.com

Resumo

O norovírus é reconhecido como agente etiológico de importância para a gastroenterite aguda não bacteriana em todo o mundo. No entanto, a significância deste patógeno em cães domésticos não é bem compreendida. Estudos sugerem que os cães podem desempenhar papel na transmissão do norovírus humano, e que os humanos apresentam anticorpos contra o norovírus canino. O objetivo deste trabalho foi realizar uma investigação preliminar quanto à presença do RNA do norovírus em fezes diarreicas de cães atendidos em hospital veterinário de Cuiabá, por meio da técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR). Para tal, 30 amostras fecais de filhotes com gastroenterite aguda, pertencentes a ambos os sexos e raças variadas, foram avaliadas para a presença do norovírus pela RT-PCR e para o parvovírus canino-2 através de teste imunocromatográfico. Neste estudo, a excreção do norovírus pelas fezes diarreicas dos cães avaliados não foi detectada, não sendo observada a amplificação de fragmento genômico parcial correspondente à região que codifica a RNA polimerase viral. Além disso, 76% (23/30) dos animais testados foram diagnosticados para a infecção pelo parvovírus canino-2 através de teste imunocromatográfico para detecção do antígeno viral. Na América do Sul e no Brasil, estudos abrangendo o norovírus canino são escassos. Apesar das gastroenterites agudas em cães filhotes serem frequentes, o norovírus parece não ser o principal agente viral envolvido no município do estudo. Contudo, a realização de investigações de epidemiologia molecular mais abrangentes será essencial para verificar a sua prevalência em populações caninas, assim como para elucidar a significância desta infecção viral em quadros de gastroenterite em cães.

Palavras-chave: Diarreia. Calicivírus. PCR.

Abstract

Norovirus is recognized as an important etiological agent for acute non-bacterial gastroenteritis worldwide. However, the significance of this pathogen in domestic dogs is not well understood. Studies suggest that dogs may play a role in transmitting norovirus to humans, and that humans have antibodies against canine norovirus. The aim of this study was to carry out a preliminary investigation regarding the presence of norovirus RNA in diarrheal feces of dogs attended at a Veterinary Hospital in Cuiabá municipality, using a reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. For this purpose, 30 fecal samples from puppies with acute gastroenteritis, belonging to both sexes and several breeds, were evaluated for the presence of norovirus by RT-PCR and for canine parvovirus-2 by immunochromatographic test. In this study, the excretion of the norovirus by the diarrheal feces of the evaluated dogs was not detected, not being observed the amplification of the partial genomic fragment corresponding to the region that encodes the viral RNA polymerase. In addition, 76% (23/30) of the tested dogs were diagnosed with canine parvovirus-2 infection through an immunochromatographic test for viral antigen detection. In South America and Brazil, studies investigating canine norovirus are scarce. Although acute gastroenteritis are frequent in puppies, it seems that norovirus is not the major viral agent involved in cases from the municipality studied. Accordingly, the conduction of further epidemiological and molecular investigations will be essential to verify its prevalence in canine populations, as well as to elucidate the significance of this viral infection in cases of gastroenteritis in dogs.

Keywords: Diarrhea. Calicivirus. PCR.

1 Introdução

Os norovírus (NoVs) pertencem ao gênero *Norovirus* da família *Caliciviridae*, são desprovidos de envelope, apresentam genoma de RNA linear, fita simples, polaridade positiva, com extensão de aproximadamente 7,5 kilobases (Vinjé *et al.*, 2019). Com base na diversidade de aminoácidos da proteína viral VP1 e de nucleotídeos da enzima RdRp, atualmente dez genogrupos são descritos (GI a GX) e divididos em 49 genótipos (Chhabra *et al.*, 2019). Norovírus humanos (HuNoV – *human norovirus*) são classificados nos

GI, GII, GIV, GVII, GVIII e GIX (Green, 2013; Vennema; De Bruin; Koopmans, 2002). Por outro lado, os genogrupos relacionados aos cães são apenas os GIV, GVI e GVII. Os demais genogrupos foram identificados em suínos (GII), bovinos e ovinos (GIII), roedores (GV) e morcegos (GX), sugerindo uma forte segregação de genogrupos com base em ordens taxonômicas (Chhabra *et al.*, 2019; Ford-Siltz *et al.*, 2019; Vinjé, 2015).

Estes agentes virais foram descobertos em 1972 (Dolin *et al.*, 1972; Kapikian *et al.*, 1972) e atualmente são reconhecidos como os principais agentes etiológicos da gastroenterite

aguda não bacteriana que afeta seres humanos de todas as idades em diversas regiões do mundo, determinando quadros graves especialmente em idosos e em indivíduos imunocomprometidos (Glass; Parashar; Estes, 2009; Patel *et al.*, 2008).

Ao contrário das infecções pelos NoVs em humanos, a importância destes vírus como patógenos em cães domésticos não é bem compreendida. A primeira evidência consistente da infecção pelo norovírus canino (CaNoV – *canine norovirus*) foi descrita na Itália em 2007, onde um filhote de cão com 60 dias de idade e sem raça definida apresentou quadro de gastroenterite, com recuperação clínica completa após quatro dias de tratamento suporte. A avaliação longitudinal de amostras fecais deste animal resultou na confirmação da excreção do CaNoV por 22 dias, assim como demonstrou coinfeção com o parvovírus canino-2 (CPV-2; espécie *Protoparvovirus carnivoran1*). Curiosamente, esta primeira cepa viral caracterizada molecularmente a partir de cão doméstico se mostrou geneticamente relacionada à cepa de NoV pertencente ao genogrupo GIV e identificada anteriormente em um filhote de leão de cativeiro do mesmo país, com enterite hemorrágica grave (Martella *et al.*, 2008).

Posteriormente, novos relatos da circulação de NoV em cães provenientes de outros países da Europa, da América e da Ásia foram realizados (Caddy *et al.*, 2013; Ford-Siltz *et al.*, 2019; Mesquita *et al.*, 2010; Soma *et al.*, 2015; Tse *et al.*, 2012). Estudos mostraram que o CaNoV pode ser detectado com frequências variáveis (2 a 40%) em amostras fecais de cães com sinais clínicos de gastroenterite, porém também foi demonstrada a infecção viral em 9% dos cães saudáveis de abrigos municipais, clínicas veterinárias e pet shops de Portugal (Martella *et al.*, 2009; Mesquita *et al.*, 2010). Nesta última investigação tanto cães apresentando diarreia quanto cães sem esta alteração clínica foram avaliados, sendo que a infecção pelo CaNoV foi estatisticamente associada com enterite. Além disso, a ocorrência de coinfeções por CaNoV e CPV-2 foi observada em cerca de 17% dos animais (Mesquita *et al.*, 2010). No Japão, a análise de amostras diarreicas de cães, coletadas entre 2007 e 2014, revelou a excreção de CaNoV em apenas 2% dos animais sintomáticos investigados, sendo que coinfeções com CPV-2 e coronavírus canino entérico (CCoV; espécie *Alphacoronavirus 1*) prevaleceram nestes animais (Soma *et al.*, 2015).

O envolvimento do CaNoV em surto de diarreia em cães foi descrito em filhotes, com cerca de 3 meses de idade, pertencentes a mesmo canil da Grécia. Neste caso, todos os animais que apresentaram enterite estavam infectados por mesma cepa de CaNoV, assim como pelo CCoV (Ntafis *et al.*, 2010). No entanto, apesar da detecção destes vírus em cães com diarreia, a elucidação concreta do potencial patogênico dos CaNoVs em quadros de enterite em cães ainda não foi estabelecida. Acredita-se que a mesma somente poderá ser obtida com a realização de estudos de infecção experimental

em cães gnotobióticos (Bodnar *et al.*, 2007; Mesquita *et al.*, 2010; Ntafis *et al.*, 2010).

A importância das infecções pelos NoVs na espécie canina não se deve apenas por sua provável participação em quadros entéricos. Uma vez que vários estudos têm sugerido a ocorrência de transmissão zoonótica dos NoVs para os seres humanos, a hipótese de que os cães poderiam desempenhar papel na transmissão destes patógenos para humanos tem sido levantada. O achado de que amostras de soro caninas foram positivas para a presença de anticorpos contra o HuCoV em investigações envolvendo cães de diversos países da Europa contribui para essa possibilidade (Caddy *et al.*, 2015; Mesquita *et al.*, 2014). Além disso, HuNoV foi identificado em amostras de fezes de cães que estavam em contato direto com tutores apresentando gastroenterite por NoV, sendo que a cepa detectada em um cão foi idêntica à isolada das fezes de seu tutor (Summa; Von Bonsdorff; Maunula, 2012). Outro indício do possível papel do cão como fonte de infecção destes agentes virais para humanos é a detecção mais frequente de IgG contra o CaNoV em médicos veterinários que trabalham com pequenos animais em comparação à população humana geral, ou seja, sem alto risco de exposição a fezes caninas (Mesquita *et al.*, 2013).

Devido à sua estreita relação com os seres humanos, como animais de companhia, os cães atraem atenção especial em relação às zoonoses, sendo justificada a realização de investigações epidemiológicas envolvendo patógenos com potencial zoonótico, como o NoV (Caddy *et al.*, 2015; Mesquita *et al.*, 2013; Summa; Von Bonsdorff; Maunula, 2012). Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi realizar uma investigação preliminar quanto a presença de NoVs em fezes diarreicas de 30 cães atendidos em hospital veterinário do município de Cuiabá, Mato Grosso, através da técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).

2 Material e Métodos

2.1 Amostras clínicas

Trinta amostras fecais de cães com gastroenterite aguda, provenientes de atendimentos clínicos realizados em 2016 no Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá, foram obtidas a partir dos recintos onde os animais foram mantidos durante o período de internação e avaliadas posteriormente. Os respectivos tutores destes animais foram informados sobre os objetivos do estudo e, somente após concordarem em participar, as amostras de fezes foram incluídas no estudo. As amostras foram acondicionadas em tubos coletores estéreis e congeladas a -20 °C, brevemente, até o momento da análise.

Dos 30 cães incluídos no estudo, 17 eram machos e 13 eram fêmeas, com idade variando entre 1 mês a 1 ano, e pertencentes a raças variadas, como SRD (n = 10), Pitbull (n = 6), Shih-Tzu (n = 3), Lhasa Apso (n = 3), Rottweiler (n = 3), Pinscher (n = 3), Husky Siberiano (n = 1) e Pastor Belga

(n = 1). Quanto aos sinais clínicos apresentados pelos cães, 20 manifestavam anorexia ou hiporexia, 17 apresentavam hematoquezia e êmese foi observada em 25 cães.

Rotineiramente no referido Hospital Veterinário, os cães atendidos com gastroenterite aguda, eram submetidos ao teste imunocromatográfico para parvovirose canina, sendo que as amostras fecais foram submetidas ao kit comercial Alere[®] Parvovirose Ag Test Kit (Bionote, Gyeonggi-do, Coréia do Sul), conforme as instruções do fabricante, e a leitura realizada entre cinco a 10 minutos após a aplicação das amostras.

2.2 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)

Inicialmente, para minimizar o efeito de possíveis agentes inibidores da reação de PCR presentes nas amostras clínicas, alíquotas de fezes foram diluídas e suspensas em água tratada com dicarbonato de dietila (DEPC) a 10% (p/v), homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 ×g por três minutos. Posteriormente, o RNA total foi extraído a partir de 200µL do sobrenadante da suspensão fecal, utilizando o kit QIAamp[®] cador[®] Pathogen Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

Após a obtenção do RNA purificado a partir das amostras fecais, etapa inicial de desnaturação utilizando 0,4 pmol do primer p289 foi executada por cinco minutos a 65 °C, seguida de banho de gelo por cinco minutos adicionais. Posteriormente, para a transcrição reversa foi utilizado 5X Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 0,1 M de DTT, 100 µM de dNTPs, 100 U de M-MLV (200 U/µl) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e água ultrapura. As condições de tempo e temperatura da transcrição reversa foram 30 minutos a 42 °C e cinco minutos a 95 °C. A amplificação de fragmento parcial da região genômica que codifica a RdRp, representado por um *amplicon* com extensão de 315 pb, foi realizada por PCR convencional com os primers p289 (5'-TGACAATGTAATCATCACCATA-3') e p290 (5'-GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC-3') (Jiang *et al.*, 1999). Para reação com volume final de 50 µl, foram utilizados 8 µl de cDNA, 1X PCR Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl], 200 µM de dNTPs, 2 mM MgCl₂, 0,4 pmol de cada primer, 2,5 U de Platinum *Taq* Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e água ultrapura. As condições de tempo e temperatura consistiram em etapa inicial de desnaturação a 94 °C por três minutos, seguida de 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 49 °C por 20 segundos e 72 °C por um minuto, e etapa de extensão final a 72 °C por sete minutos. Para cada reação, uma alíquota de plasmídeo contendo cDNA referente ao NoV GII.4 e água ultrapura foram incluídos como controles positivo e negativos, respectivamente. Alíquota de 5 µl do produto obtido na PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (0,5 mg/ml) e avaliado sob luz UV em transiluminador (Loccus, São Paulo, Brasil).

3 Resultados e Discussão

Neste estudo, a excreção do NoV não foi detectada nos 30 cães com gastroenterite aguda avaliados, sendo que o fragmento genômico parcial, correspondente a região que codifica a RdRp, não foi amplificado pela técnica de RT-PCR empregada, a partir das amostras de fezes diarreicas. Além disso, dentre os animais avaliados, 76% (23/30) foram diagnosticados para infecção pelo CPV-2 através de teste imunocromatográfico para detecção do antígeno viral, e destes, três vieram a óbito.

Em estudos anteriores realizados no Japão e em países europeus (Alemanha, Itália, França, Espanha, Portugal e Grécia), utilizando a mesma estratégia de detecção molecular empregada neste trabalho, o NoV foi identificado em cães com diarreia cuja prevalência variou de 2,2 a 11%, sendo possível afirmar que os primers utilizados no presente trabalho são capazes de detectar o NoV em cães. As maiores frequências de detecção de NoV em estudos moleculares envolvendo primers inespecíficos foram relatadas na Itália (11/239; 4,6%), Espanha (2/26; 7,6%), Grécia (7/72; 9,7%) e Japão (4/97; 4,1%) (Bodnar *et al.*, 2017; Martella *et al.*, 2009; Ntafis *et al.*, 2010; Soma *et al.*, 2015).

A ausência de detecção do RNA do NoV em amostras fecais diarreicas dos cães avaliados neste estudo divergiu dos relatos dos EUA, Japão e países europeus (Bodnar *et al.*, 2017; Ford-Siltz *et al.*, 2019; Mesquita *et al.*, 2010; Soma *et al.*, 2015), embora diferentes combinações de primers tenham sido utilizados nos diversos estudos.

Caddy *et al.* (2015) encontraram resultados semelhantes em estudo realizado no Reino Unido, através de PCR em tempo real, avaliando 248 amostras fecais, diarreicas ou não, de cães com média de idade de cinco anos e provenientes de seis clínicas veterinárias e de um abrigo do país, cujo resultado foi negativo para a detecção do RNA viral de HuNoV e CaNoV. Os dados encontrados divergem apenas quanto à média de idade dos animais, sendo que no presente estudo somente cães filhotes foram avaliados.

Estudo realizado nos Estados Unidos demonstrou alta prevalência (38,2%) da infecção pelo CaNoV no período de 2009 a 2013, enquanto em 2017 foi observado apenas 9,7% de cães infectados, através da técnica de RT-PCR. Neste estudo também foi realizado o sequenciamento genômico de 10 amostras, revelando grande diversidade de cepas identificadas, sendo quatro pertencentes ao GIV.2, três ao GVI.1 e três ao GVI.2 (Ford-Siltz *et al.*, 2019).

Por outro lado, na América do Sul, as pesquisas abrangendo o CaNoV são escassas, sendo descrita apenas a detecção de NoV pertencente ao GVII em uma amostra de esgoto doméstico em estudo realizado no Uruguai (Lizasoain *et al.*, 2015). Da mesma forma, no Brasil, os estudos realizados para detecção de CaNoV são raros. Em hospital veterinário privado no Rio de Janeiro, a presença do vírus não foi evidenciada em 232 amostras de fezes diarreicas de cães com menos de um

ano de idade (Castro *et al.*, 2013). A ausência de excreção de NoV em cães no Rio de Janeiro reforça os achados obtidos no presente trabalho, sugerindo a não circulação do vírus em filhotes de cães com diarreia nos municípios estudados. Diante destes achados, recomenda-se a realização de investigações semelhantes e mais abrangentes em populações caninas destas e de outras regiões do país.

Recentemente, no Estado do Mato Grosso, em investigação realizada por Silveira *et al.* (2018) a presença do NoV foi detectada em amostras fecais de onças-pintadas da região do Pantanal, cuja infecção pode estar associada a contaminação ambiental devido à falta de saneamento básico em vários municípios. O vírus detectado nas onças-pintadas foi caracterizado como GII.11, semelhante ao NoV de suínos. Além da detecção do vírus em onças da região, a recente detecção do NoV em amostras de águas superficiais (rios e lagos), potável e de esgoto, em Reserva Particular do Patrimônio Natural na região do Pantanal, cercada pelos rios Cuiabá e São Lourenço, demonstrou a ocorrência de uma fonte potencial de contaminação viral, indicando que o agente é circulante na região em estudo (Fumian *et al.*, 2018).

O potencial de transmissão de CaNoVs para seres humanos ainda é incerto. No entanto, a detecção de IgG contra CaNoV em amostras de soros de médicos veterinários, em maior frequência em comparação a uma população controle, sugere a infecção por estes patógenos em seres humanos altamente expostos a cães e suas excretas (Mesquita *et al.*, 2013). De maneira semelhante, o papel do cão na epidemiologia de surtos determinados pelo HuNoV em populações humanas ainda é desconhecido. O fato de estas ocorrências serem mais frequentes em locais onde os cães não são comumente encontrados, como em navios de cruzeiro ou em hospitais, não descarta a possibilidade de os cães servirem como fonte de infecção para surtos em comunidades (Caddy *et al.*, 2015). O registro de surto limitado de gastroenterite em canil localizado na Tailândia, após o contato dos animais com crianças sintomáticas e infectadas pelo NoV demonstra a transmissão de HuNoVs para os cães, reforçando as preocupações relacionadas a transmissão destes agentes entre estas duas espécies (Charoenkul *et al.*, 2020).

A gastroenterite viral é um problema clínico comum em cães e durante várias décadas o CPV-2 foi considerado o principal agente viral envolvido nestes quadros (Decaro *et al.*, 2011; Gizzi *et al.*, 2014). Vários estudos moleculares, que envolveram a detecção tanto dos NoVs como de outros agentes virais relevantes para diarreia em cães, falharam em identificar os NoVs em cães sintomáticos ou revelaram o caráter comum de coinfeções com CPV-2 e CCoV (Caddy *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2013; Martella *et al.*, 2008; Mesquita *et al.*, 2010; Soma *et al.*, 2015). Um exemplo foi a ausência de detecção de NoVs em cães com e sem diarreia do Reino Unido, indicando uma incidência insignificante destas infecções na população canina daquela região, a época da amostragem. Em contrapartida, este mesmo estudo revelou a

excreção fecal a altos títulos do CPV-2 e do CCoV em 17% dos cães com diarreia, fato que levou os autores a concluir que os NoVs não constituíram causa importante de diarreia viral na população canina estudada (Caddy *et al.*, 2015). No presente estudo, coincidentemente, também foi detectada alta frequência de excreção fecal do CPV-2 (76%), através de teste imunocromatográfico, em cães com gastroenterite sem evidência de infecção por CoVs.

4 Conclusão

Apesar da recente identificação do NoV em águas fluviáteis de uma Reserva Particular e em amostras fecais de onças-pintadas do Pantanal Mato-Grossense, não foi possível detectar a excreção viral nas amostras de fezes diarreicas de cães avaliados em Cuiabá. Apesar das gastroenterites agudas em cães filhotes serem um grande problema na rotina de atendimentos veterinários, o NoV parece não ser o principal agente viral no município do estudo, podendo esta afecção estar relacionada a outros agentes virais e/ou bacterianos, como o CPV-2. Existem poucos relatos sobre a ocorrência da infecção pelo CaNoV no mundo, sendo necessária a realização de novas pesquisas para esclarecer a importância desta virose em cães.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) sob número de processo: 332043/2012. Os autores também agradecem ao Prof. Dr. Tatsuya Nagata pelo fornecimento do controle positivo do NoV GII.4.

Referências

- BODNAR, L. *et al.* Identification of a novel canine norovirus. *Infect. Genet. Evol.*, v.52, p.75-81, 2017. doi: 10.1016/j.meegid.2017.04.020.
- CADDY, S. *et al.* Serological evidence for multiple strains of canine norovirus in the UK dog population. *PLoS One*, v.8, n.12, p.e81596, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0081596.
- CADDY, S.L. *et al.* Evidence for human norovirus infection in dogs in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.*, v.53, n.6, p.1873-1883, 2015. doi: 10.1128/JCM.02778-14.
- CASTRO, T.X. *et al.* Molecular characterisation of calicivirus and astrovirus in puppies with enteritis. *Vet. Rec.*, v.172, n.21, p.557, 2013. doi: 10.1136/vr.101566.
- CHAROENKUL, K. *et al.* Human norovirus infection in dogs, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.*, v.26, n.2, p.350-353, 2020. doi: 10.3201/eid2602.191151.
- CHHABRA, P. *et al.* Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J. Gen. Virol.*, v.100, n.10, p.1393-1406, 2019. doi: 10.1099/jgv.0.001318.
- DECARO, N. *et al.* Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. *Vet. J.*, v.187, n.2, p.195-199, 2011. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.10.027.
- DOLIN, R. *et al.* Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.140, n.2, p.578-583, 1972. doi: 10.3181/00379727-140-36508.

- FORD-SILTZ, L.A. *et al.* Genomics analyses of GIV and GVI noroviruses reveal the distinct clustering of human and animal viruses. *Viruses*, v.11, n.3, p.204, 2019. doi: 10.3390/v11030204.
- FUMIAN, T.M. *et al.* Enteric viruses' dissemination in a private reserve of natural heritage. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.66, n.4, p.313-320, 2018. doi: 10.1111/lam.12848.
- GIZZI, A.B.R. *et al.* Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. *BMC Vet. Res.*, v.10, p.23, 2014. doi: 10.1186/1746-6148-10-23.
- GLASS, R.I.; PARASHAR, U.D.; ESTES, M.K. Norovirus gastroenteritis. *N. Engl. J. Med.*, v.361, n.18, p.1766-1785, 2009. doi: 10.1056/NEJMra0804575.
- GREEN, K.Y. Caliciviridae: the noroviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY P.M. (Ed.). *Fields Virology*. 6.ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins, 2013. p.582-608.
- JIANG, X. *et al.* Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J. Virol. Methods*, v.83, p.145-154, 1999. doi: 10.1016/s0166-0934(99)00114-7.
- KAPIKIAN, A.Z. *et al.* Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, v.10, n.5, p.1075-1081, 1972.
- LIZASOAIN, A. *et al.* Sewage surveillance reveals the presence of canine GVII norovirus and canine astrovirus in Uruguay. *Arch. Virol.*, v.160, n.11, p.2839-2843, 2015. doi: 10.1007/s00705-015-2571-3.
- MARTELLA, V. *et al.* Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg. Infect. Dis.*, v.14, n.8, p.1306-1308, 2008. doi: 10.3201/eid1408.080062.
- MARTELLA, V. *et al.* Genetic heterogeneity and recombination in canine noroviruses. *J. Virol.*, v.83, n.21, p.11391-11396, 2009. doi: 10.1128/JVI.01385-09.
- MESQUITA, J.R. *et al.* Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.*, v.16, n.6, p.980-982, 2010. doi: 10.3201/eid1606.091861.
- MESQUITA, J.R. *et al.* Presence of antibodies against genogroup VI norovirus in humans. *Virol. J.*, v.10, p.176, 2013. doi: 10.1186/1743-422X-10-176.
- MESQUITA, J.R. *et al.* Seroprevalence of canine norovirus in 14 European countries. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.21, p.898-900, 2014. doi: 10.1128/CVI.00048-14.
- NTAFIS, V. *et al.* Outbreak of canine norovirus infection in young dogs. *J. Clin. Microbiol.*, v.48, n.7, p.2605-2608, 2010. doi: 10.1128/JCM.02528-09.
- PATEL, M.M. *et al.* Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.*, v.14, n.8, p.1224-1231, 2008. doi: 10.3201/eid1408.071114.
- SILVEIRA, M.M. *et al.* Detection of noroviruses in free-ranging jaguars (*Panthera onca*) in the Pantanal, Mato Grosso, Brazil. *Arch. Virol.*, v.163, n.7, p.1961-1963, 2018. doi: 10.1007/s00705-018-3789-7.
- SOMA, T. *et al.* Detection of norovirus and sapovirus in diarrheic dogs and cats in Japan. *Microbiol. Immunol.*, v.59, n.3, p.123-128, 2015. doi: 10.1111/1348-0421.12223.
- SUMMA, M.; VON BONSDORFF, C.H.; MAUNULA, L. Pet dogs – a transmission route for human noroviruses? *J. Clin. Virol.*, v.53, n.3, p.244-247, 2012. doi: 10.1016/j.jcv.2011.12.014.
- TSE, H. *et al.* Complete genome sequences of novel canine noroviruses in Hong Kong. *J. Virol.*, v.86, n.17, p.9531-9532, 2012. doi: 10.1128/JVI.01312-12.
- VENNEMA, H.; DE BRUIN, E.; KOOPMANS, M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Virol.*, v.25, n.2, p.233-235, 2002. doi: 10.1016/s1386-6532(02)00126-9.
- VINJÉ, J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.*, v.53, n.2, p.373-381, 2015. doi: 10.1128/JCM.01535-14.
- VINJÉ, J. *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Caliciviridae. *J. Gen. Virol.*, v.100, n.11, p.1469-1470, 2019. doi: 10.1099/jgv.0.001332.