

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE CALICIVÍRUS HUMANOS, 2004 –
2014: VARIANTES DE NOROVIRUS GII.4, GENOGRUPO IV E SAPOVIRUS EM
AMOSTRAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS**

JULIA MONASSA FIORETTI

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Virologia

Orientadora: Dra. Marize Pereira Miagostovich

Rio de Janeiro

2016

F518 Fioretti, Julia Monassa

Estudo da diversidade genética de calicivírus humanos, 2004-2014: variantes de norovirus GII.4, genogrupo IV e sapovirus em amostras clínicas e ambientais / Julia Monassa Fioretti. – Rio de Janeiro, 2016.

xi, 33 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 83-112

1. Norovírus. 2. Sapovírus. 3. Norovírus GII.4. 4. Norovírus GIV. 5. Amostras clínicas. 6. Amostras ambientais. I. Título.

CDD 616.33019

*Mais uma vez dedico a ela, minha vizinha,
meu amor, meu coração!*

*Dedico também aos meus pais Ana e André,
por todo o suporte ao longo desses anos de
estudo. Obrigada de todo coração!*

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular por oferecer um sistema de ensino de excelente qualidade, a qual foi de extrema importância para meu aprimoramento profissional e de formação científica.

Á Dra. Tatiana Xavier Castro pelo excelente trabalho de revisão da tese.

Aos Drs. Edson Elias da Silva, Fernando do Couto Motta, Yvone Benchimol Gabbay e Marcelo Alves Pinto por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

Aos funcionários da CEDAE, principalmente o Seu Sérgio, pela atenção, gentileza e solicitude.

A todos os funcionários e estudantes que fizeram ou fazem parte do LVCA, pelos momentos de alegria, de ajuda e descontração.

À pessoa mais querida e amada do LVCA, a Chiquinha. Sua ajuda, carinho, paciência, amor e atenção são tudo o que todos nós devemos aprender a ter mais com os outros.

À minha orientadora Marize Miagostovich que, sem dúvida, foi muito mais que uma orientadora durante todos esses anos.

Ao Dr. Filipe Aníbal Carvalho-Costa pela imensa ajuda com as análises estatísticas.

À minha família, em especial aos meus pais Ana e André e aos meus irmãos Rodrigo e Artur pelo carinho, amor, atenção e ajuda.

Ao Leonardo, meu noivo, por todos esses anos de cumplicidade, por me compreender e amparar nos momentos mais difíceis.

Esta tese está no âmbito das atividades da Fiocruz como Centro Colaborador da OPAS / OMS em Saúde Pública e Ambiental.

*“E disse a Flor para o pequeno príncipe: é
preciso que eu suporte duas ou três lagartas
se quiser conhecer as borboletas”*

Antoine de Saint-Exupéry

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Histórico dos calicivírus humanos.....	2
1.2	Morfologia e genoma	5
1.3	Propriedades físico-químicas	9
1.4	Classificação	9
1.4.1	Norovírus.....	9
1.4.2	Sapovírus.....	12
1.5	Manifestações clínicas e patogênia.....	14
1.6	Ciclo replicativo.....	15
1.7	Imunidade	16
1.8	Epidemiologia.....	18
1.8.1	Transmissão.....	18
1.8.2	Faixa etária.....	20
1.8.3	Distribuição geográfica	21
1.8.3.1	Norovirus e Sapovirus no Brasil.....	24
1.8.3.2	Disseminação ambiental	25
1.9	Diagnóstico.....	26
1.10	Prevenção, controle e vacina	29
2	RELEVÂNCIA	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	Geral.....	32
3.2	Específicos	32
4	METODOLOGIAS E RESULTADOS.....	33
4.1	Temporal Dynamics of Norovirus GII.4 Variants in Brazil between 2004 and 2012	34
4.2	Surveillance of Noroviruses in Rio de Janeiro: Occurrence of genogroup IV in clinical and wastewater samples.....	41
4.3	Occurrence of human sapoviruses in wastewater and stool samples in Rio de Janeiro, Brazil	63
5	DISCUSSÃO	71
5.1	Avaliação da dinâmica temporal das variantes de NoV GII.4	71
5.1.1	Artigo 1: Temporal Dynamics of Norovirus GII.4 Variants in Brazil between 2004 and 2012	71
5.2	Detecção de Calicivírus humanos em amostras clínicas e em águas residuárias ..	74
5.2.1	Artigo 2: Surveillance of Noroviruses in Rio de Janeiro: Occurrence of genogroup IV in clinical and wastewater samples.....	74
5.2.2	Artigo 3: Occurrence of human sapoviruses in wastewater and stool samples in Rio De Janeiro, Brazil	77

5.3	Comentários finais.....	80
6	CONCLUSÕES.....	81
7	PERSPECTIVAS	82
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3CLpro – 3C-like Protease
aa – aminoácido
ABO – grupo A-B-O de histocompatibilidade
BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*
CA – Califórnia
CDC – do inglês *Center for Disease Control and Prevention*
cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar
cg – cópias genômicas
cm³ – centímetros cúbicos
Ct – do inglês *cycle threshold* (limiar do ciclo)
CaV – calicivírus
DNA – ácido desoxirribonucléico
Domínio P – do inglês domínio *Protruding*
Domínio S – do inglês domínio *Shell*
EIE – ensaios imunoenzimáticos
EUA – Estados Unidos da América
Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz
FUT – fucosil transferase
g – gramas
G – guanina
GA – gastroenterites agudas
h – horas
HBGA – do inglês *Histo-Blood Group Antigens* (antígenos de histocompatibilidade)
ICTV – do inglês *International Committee for Taxonomy of Viruses*
IgA – imunoglobulina A
IgG – imunoglobulina G
IgM – imunoglobulina M
IME – imunomicroscopia eletrônica
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
kb – kilobases
kDa – kilodaltons
L – litro
LACEN – Laboratório Central de Saúde
LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental
M – Molar
ME – microscopia eletrônica
mg – miligramas
min – minuto
mL – mililitros
n – número
NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*
NLV – do inglês *Norwalk-like viruses*
nm – nanômetro
NoV – norovirus
N-terminal – extremidade amino terminal
NS – do inglês *nonstructural protein* (Proteína não estrutural)
NTP – nucleosídeo trifosfato
NTPase – nucleosídeo trifosfato hidrolase

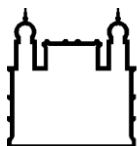
°C – graus Celsius
 OMS – Organização Mundial da Saúde
 ORF – do inglês *Open Reading Frame* (fase aberta de leitura)
 p – valor de P
 pb – pares de bases
 PCR – do inglês *polimerase chain reaction* (reação em cadeia pela polimerase)
 pH – potencial hidrogeniônico
 poli A ou (A)_n – cauda poliadenilada
 p.p.m. – partes por milhão
 qPCR – do inglês *quantitative PCR* (Reação em cadeia pela polimerase quantitativa)
 RdRp – RNA polimerase RNA dependente
 RNA – ácido ribonucleico
 RT – transcriptase reversa
 RT-PCR – do inglês *reverse transcription-PCR* (reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa)
 RVA – rotavírus grupo A
 SLV – *Sapporo-like virus*
 Subdomínio P1 – do inglês subdomínio *Protruding 1*
 Subdomínio P2 – do inglês subdomínio *Protruding 2*
 SRSV – do inglês *small, round-structured virus*
 VP1 – do inglês *Viral protein 1*
 VP2 – do inglês *Viral protein 2*
 VPg – proteína viral de ligação ao genoma
 µL – microlitros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Eletromicrografia de transmissão de partículas de sapovirus e norovirus a partir de amostras clínicas.	4
Figura 1.2: Estrutura e organização genômica dos calicivírus.	6
Figura 1.3: Representações da estrutura do capsídeo viral e da ORF2 dos norovírus. .	8
Figura 1.4: Classificação dos norovírus baseada nas árvores filogenéticas das sequências das ORF1 (RdRp) e ORF2 (VP1).	11
Figura 1.5: Árvore filogenética de sapovírus baseada na sequência nucleotídica completa da VP1 com a classificação dos genogrupos I, II, III, IV e V e seus respectivos genótipos.	13

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Proteínas dos calicivírus, com suas funções, localizações e tamanho.	7
---	---



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

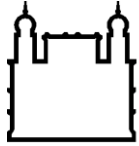
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Julia Monassa Fioretti

RESUMO

Os gêneros *Norovirus* e *Sapovirus*, pertencentes à família *Caliciviridae*, são descritos infectando humanos. Os calicivírus humanos (CaV) desempenham um importante papel como agente etiológico de surtos de gastroenterite aguda (GA) no mundo, com especial destaque para os norovirus (NoV) do genótipo GII.4 por sua diversidade e associação a pandemias. Entretanto, na última década outros membros da família, como os NoV GIV e os sapovirus (SaV), vêm sendo associados a casos de GA, porém com poucos estudos no país. Este trabalho teve como objetivo avaliar a frequência, disseminação, diversidade genética e distribuição temporal dos CaV humanos no período de 2004 – 2014 a partir de amostras clínicas e ambientais. Em um primeiro estudo, 147 amostras de NoV GII.4 obtidas de diferentes regiões do Brasil, em um intervalo de 9 anos (2004 – 2012), foram caracterizadas para determinação e avaliação da dinâmica temporal das variantes deste genótipo no país. Seis variantes foram detectadas no período (Asia_2003, Hunter_2004, Yerseke_2006a, Den Haag_2006b, New Orleans_2009 e Sydney_2012), sendo observada a emergência de novas estirpes com posterior substituição das anteriores circulantes. A principal variante detectada neste estudo, a Den Haag_2006b, apresentou duas sublinhagens temporalmente e filogeneticamente distintas. Este foi o primeiro estudo na América Latina a evidenciar o padrão de temporalidade deste genótipo em amostras provenientes de casos de GA. Para investigação dos NoV GIV e SaV foi realizado um estudo de vigilância destes vírus no estado do Rio de Janeiro utilizando amostras clínicas provenientes de casos de GA no período de 2012 – 2014 e amostras de esgoto coletadas (2013 – 2014) da principal estação de tratamento do estado. NoV GI, GII e GIV foram responsáveis por 27% (87/316) dos casos de GA estudados, sendo descrita a ocorrência do GIV em amostras de fezes pela primeira vez no Brasil. Em relação às amostras ambientais, foi observada a presença de NoV GI, GII e GIV em águas residuárias não tratadas e tratadas. Um achado importante foi a presença de GII durante todo o ano, sem padrão de sazonalidade clara, assim como a maior prevalência de GI e GIV no esgoto quando comparado com amostras clínicas. O sequenciamento parcial do gene que codifica o capsídeo demonstrou a circulação do NoV GIV, com identidade nucleotídica variando entre 99.3 a 100% entre amostras clínicas e ambientais. A circulação de SaV foi demonstrada em 3.5% (12/342) das amostras clínicas e pela primeira vez no país em amostras ambientais (51/156 [33.0%]), sendo caracterizados como SaV GI.1, GI.2, GI.6, GII.1 e GV.I. O elevado percentual de positividade em amostras de águas residuárias sugere a ocorrência de casos assintomáticos destes vírus. A utilização de duas abordagens metodológicas demonstrou diferenças na frequência, diversidade genética e padrões de sazonalidade destes vírus, revelando o impacto dos CaV humanos como agentes etiológicos de casos de GA no Estado e enfatizando a necessidade de se estabelecer redes de diagnóstico e vigilância, principalmente pela rápida capacidade evolutiva, em especial do NoV GII.4, responsáveis por pandemias após a introdução de novas variantes.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Julia Monassa Fioretti

ABSTRACT

Human calicivirus (CaV), belonging to *Norovirus* and *Sapovirus* genres of *Caliciviridae* family, play an important role as an etiologic agent of acute gastroenteritis (AGE) outbreaks in the world, with special emphasis on the norovirus GII.4 genotype (NoV) for its diversity and association with pandemics. However, in the last decade, other family members as GIV NoV and Sapovirus (SaV) have been associated with cases of AGE, however few studies in the country have been performed. This study aimed to evaluate the frequency, spread, genetic diversity and temporal distribution of human CaV during the period of 2004 to 2014 from clinical and environmental samples. In the first study, 147 samples of GII.4 NoV, obtained from different regions of Brazil, in a range of 9 years (2004 – 2012), were characterized in order to determine and evaluate the temporal dynamics of variants of this genotype in the country. Six variants were detected in the period (Asia_2003, Hunter_2004, Yerseke_2006a, Den Haag_2006b, New Orleans_2009 and Sydney_2012), and observed the emergence of new strains with subsequent replacement of the previous circulating. The main variant detected in this study, Den Haag_2006b, presented two sublineages temporally and phylogenetically distinct. This was the first study in Latin America that demonstrates the seasonality pattern of this genotype in samples from AGE cases. For investigation of GIV NoV and SaV, was performed a surveillance study of these viruses in Rio de Janeiro State by using clinical samples from AGE cases during 2012 – 2014 and sewage samples collected (2013 – 2014) from the main treatment plant of State. GI, GII and GIV NoV accounted for 27% (87/316) of AGE cases studied, with the description of occurrence of GIV in stool samples for the first time in Brazil. Regarding the environmental samples, were observed the presence of GI, GII and GIV NoV in treated and untreated wastewater. An important finding was the presence of GII throughout the year, with no clear seasonality pattern, as well as a higher prevalence of GI and GIV in sewage when compared with clinical specimens. The partial sequencing of the gene that codifies for capsid revealed the circulation of GIV NoV with nucleotide identities ranging from 99.3 to 100% between clinical and environmental samples. SaV circulation was demonstrated in 3.5% (12/342) of clinical specimens and for the first time in the country in environmental samples (51/156 [33.0%]), being characterized as SaV GI.1, GI.2, GI.6, GII.1 and GV.I. The high positivity rate in wastewater samples suggests the occurrence of asymptomatic cases of these viruses. The use of two methodological approaches demonstrated differences in the frequency, genetic diversity and seasonality patterns of these viruses, revealing the impact of human CaV as agents of AGE cases in the State and emphasizing the need to establish diagnostic and surveillance networks, especially by the rapid evolutionary capacity, in particular NoV GII.4 responsible for pandemics after the introduction of new variants.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) aproximadamente 842 mil pessoas morrem anualmente de gastroenterite aguda (GA), a qual é associada à ineficiência de saneamento básico, higienização das mãos e acesso inadequado a água potável. Dados recentes demonstram que, em 2015, 91% da população mundial passou a ter acesso adequado a fonte de água potável, com um aumento de 2,6 bilhões de pessoas tendo acesso a essa melhoria nos últimos 25 anos. Entretanto, 663 milhões de pessoas ainda não têm acesso a abastecimento de água potável (OMS e Unicef 2015).

Uma modesta redução na morbidade da GA (11 – 16%) pode ser obtida por melhorias nas instalações básicas de água ou de saneamento, assim como a mortalidade de 361 mil crianças com idade inferior a 5 anos poderia ser evitada a cada ano se esses fatores de risco fossem extinguidos (OMS, 2014). Entretanto, o benefício na saúde da população é limitado, uma vez que essas fontes de água potável podem ser contaminadas, assim como o saneamento básico pode não proteger adequadamente a população da exposição a excrementos.

A falta de acesso a água tratada afeta desproporcionalmente as pessoas que vivem em situação de pobreza em regiões em desenvolvimento. No entanto, mesmo as populações que vivem em países que tem abastecimento de água potável e tratamento adequado de esgoto estão propensas a surtos de doenças transmitidas por água. Somente nos Estados Unidos da América (EUA), durante os anos de 2009 e 2010, por exemplo, foram relatados 33 surtos de GA associados ao consumo de água contaminada (CDC, 2013). Entretanto, independentemente da condição socioeconômica de um país, as gastroenterites de origem viral causadas por água contaminada são consideradas significativamente subnotificadas, não somente pelas limitações na detecção dos agentes etiológicos, mas também pelo fato de que indivíduos acometidos não procuram atendimento médico para infecções auto limitantes (CDC, 2013).

No Brasil, segundo a OMS, 34% da população obteve acesso ao saneamento básico nos últimos 25 anos (OMS e Unicef 2015), o que coincidiu com dados de diminuição da mortalidade por doenças diarreicas no país. Outra importante contribuição para a diminuição da mortalidade da GA no Brasil se deve à

implementação no calendário de vacinação da vacina monovalente anti-Rotavírus A (RVA), (Rotarix®). Os RVA, conhecidos como os principais agentes virais responsáveis pela diarreia infantil aguda, teve seu impacto reduzido principalmente pela diminuição da gravidade da doença em crianças menores de cinco anos. Neste contexto, os calicivírus (CaV) humanos, representados pelos membros dos gêneros *Norovirus* (NoV) e *Sapovirus* (SaV) pertencentes a família *Caliciviridae* têm assumido um papel crescente nos casos de GA, com destaque para os NoV que atualmente são responsáveis por 18% de todos os casos de GA no mundo (Ahmed et al., 2014). O crescente impacto dos CaV humanos em casos de GA, reflete não somente uma melhora no diagnóstico, mas também a diversidade genética deste grupo de vírus, objeto deste estudo.

1.1 Histórico dos calicivírus humanos

A expressão *winter vomiting disease* foi utilizada pela primeira vez por Zahorsky (1929) para descrever uma doença súbita e autolimitada, que ocorria geralmente durante o inverno e tinha como principais sintomas diarreia, vômito e dores abdominais. Durante as décadas de 1940 e 1950 muitos estudos foram realizados para elucidação de surtos e casos esporádicos de GA não-bacteriana com os mesmos sintomas do *winter vomiting disease* ocorridos nos Estados Unidos e Japão. Filtrados de fezes e/ou lavados de esôfago de pessoas acometidas eram administrados oralmente em voluntários, que após um período de incubação de aproximadamente 48 horas, desenvolviam os mesmos sintomas como náuseas, dores abdominais, vômito e diarreia (Reimann et al., 1945; Gordon et al., 1947; Kojima et al., 1948; Yamamoto et al., 1948; Jordan et al., 1953; Fukumi et al., 1957). Em outubro de 1968 um surto ocorrido em uma escola em Norwalk, Ohio, EUA com as mesmas características descritas por Zahorsky (1929), também foi caracterizado como *winter vomiting disease*. Contudo, na ocasião, estudos laboratoriais não identificaram o agente etiológico envolvido (Adler e Zick, 1969). Posteriormente, Kapikian e colaboradores (1972) utilizando amostras clínicas deste surto identificaram, pela primeira vez, por imunomicroscopia eletrônica, partículas de aproximadamente 27 nm de diâmetro, com características semelhantes a vírus, em filtrados de fezes que induziram em voluntários os mesmos sintomas da doença. O agente de Norwalk foi o primeiro vírus descrito associado a casos de GA, sendo inicialmente nomeado de

picorna ou parvovirus-like por apresentar morfologia semelhante a estes vírus, no entanto foi posteriormente denominado *Norwalk-like viruses*. Estudos posteriores demonstraram que outros vírus com morfologia pequena e arredondada, denominados *small round-structured virus* (SRSV), similares aos encontrados por Kapikian e colaboradores (1972), estavam associados com outros surtos de GA. Estes agentes infecciosos foram denominados a partir da localidade onde foram primeiramente descritos, como Hawaii, Snow Mountain, Sapporo, Southampton, Toronto, México e Montgomery County. Entretanto, o *Norwalk-like virus* permaneceu como protótipo dos SRSVs por ter sido o primeiro a ser descrito (Wyatt et al., 1974; Chiba et al., 1979; Dolin et al., 1982; Leers et al., 1987; Lambden et al., 1993; Jiang et al., 1995).

A classificação destes vírus foi inicialmente baseada na morfologia apresentada a partir da visualização de suas partículas por imunomicroscopia eletrônica (Kapikian et al., 1972) (Figura 1.1). Entretanto, em um estudo realizado por Greenberg e colaboradores (1981) foi revelada a presença de uma proteína estrutural de 59 kDa em vírions do agente de Norwalk purificados a partir de filtrados de fezes. As características dessa proteína principal estavam relacionadas à família *Caliciviridae*, que tinha sido criada anteriormente pelo III Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Matthews, 1979). Esta nova família de vírus de fita simples e polaridade positiva tinha como principais características a presença de uma proteína estrutural única, a partir da qual o capsídeo viral era composto e com a aparência de 32 depressões em forma de taça em sua superfície, dispostos em simetria icosaédrica. O nome dessa família foi derivado da palavra latina *calix* que significa cálice ou taça. Outra característica era a ausência de um cap metilado na extremidade 5' do RNA viral. Em vez deste, era descrita a presença de uma pequena proteína (VPg) de aproximadamente $10 - 12 \times 10^3$ Da ligada covalentemente ao RNA viral, que foi demonstrada como essencial para a infecciosidade do RNA (Black et al., 1978; Burroughs et al., 1978).

Na década de 1990 o avanço das técnicas de biologia molecular possibilitou a clonagem e sequenciamento completo do genoma do *Norwalk-like virus* (Jiang et al., 1990; Lambden et al., 1993). Análises filogenéticas corroboraram sua inclusão na família *Caliciviridae*, assim como os outros CaV humanos, descritos anteriormente. Em 1998, o ICTV aprovou a proposta de criação de mais dois gêneros na família *Caliciviridae*, o gênero *Norwalk-like virus* (NLV), tendo como espécie protótipo o vírus

Norwalk e o gênero *Sapporo-like virus* (SLV), com o vírus Sapporo como protótipo (Green et al., 2000). Apenas em 2005, o ICTV renomeou o gênero *Norwalk-like virus* para *Norovirus* e o gênero *Sapporo-like virus* para *Sapovirus*.

Atualmente, a família *Caliciviridae* é constituída por vírus pequenos (27 – 40 nm), não-envelopados e icosaédricos, os quais possuem RNA fita simples de polaridade positiva em seu genoma. Os cinco gêneros dessa família são denominados *Norovirus*, *Sapovirus*, *Nebovirus*, *Lagovirus* e *Vesivirus*, os quais os dois primeiros são descritos infectando humanos, causando GA. Os três últimos são CaV de importância veterinária: *Nebovirus* (NeV), representado pelo vírus Newbury-1 (NBV), que causa diarreia em bovinos; *Lagovirus* (LaV), representado pelo vírus da doença hemorrágica em coelhos (RHDV), e vírus da lebre marrom europeia (EBHSV); e *Vesivirus* (VeV), representado pelo CaV de felinos (FCV) e vírus do exantema vesicular de suínos (VESV) (Glass et al., 2009).

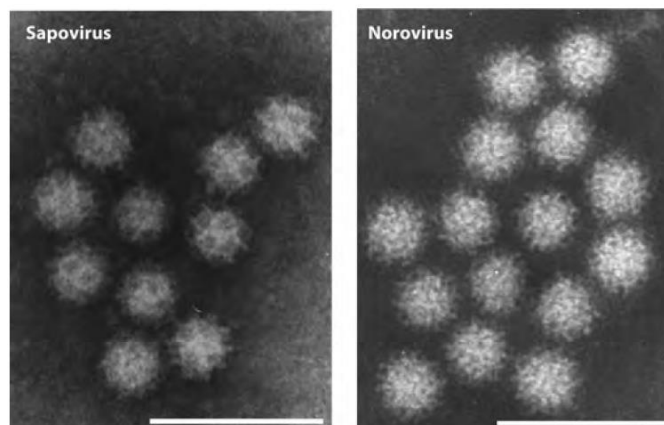


Figura 1.1: Eletromicrografia de transmissão de partículas de sapovirus e norovirus a partir de amostras clínicas.

Escala indica 100 nm. Adaptado de Oka et al., 2015.

1.2 Morfologia e genoma

Os CaV exibem simetria icosaédrica $T = 3$, com capsídeo formado por 180 moléculas da proteína viral (VP1), que se organizam em 90 dímeros, formando 32 arcos protuberantes arranjados em forma de “cálice”, sendo esta a origem do nome desta família. Essa morfologia confere aos SaVs a aparência de estrela de Davi, característica esta que não é observada nas partículas de NoVs (Figura 1.1) (Prasad et al., 1994; Green et al., 2007).

O genoma dos CaV é composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva com tamanho entre 7,3 e 8,5 kb. Sua extremidade 5' contém a proteína viral (VPg), que está covalentemente ligada, enquanto que na extremidade 3' uma cauda poliadenilada é observada. Uma curta região conservada (CR, *conserved region*) no final da extremidade 5' se repete internamente no genoma próxima ao sítio de início da transcrição de um RNA subgenômico produzido durante a biossíntese viral, que atua como molde para a tradução das proteínas estruturais do vírion. As proteínas não estruturais (NS) são codificadas próximas à extremidade 5' do genoma enquanto as proteínas estruturais (VP1 e VP2) são codificadas próximas à extremidade 3'. O genoma dos NoV possui três regiões abertas de leitura (ORF) enquanto o dos SaV possuem duas (GI, GIV e GV) ou três (GII e GIII) (Hansman et al., 2004; Hardy 2005) (Figura 1.2). O genoma dos SaV é organizado de modo que a sequência da principal proteína do capsídeo (VP1) está na mesma fase de leitura que as proteínas não estruturais; no genoma dos NoV, a VP1 está localizada na ORF2. Uma grande poliproteína codificada pela ORF1 é traduzida a partir do RNA viral e é processada em precursores ou produtos finais pela protease viral (NS6^{PRO}). A estratégia de processamento proteolítico varia entre os diferentes calicivírus; contudo, todos os vírus codificam domínios para 7 proteínas não estruturais (NS1 – NS7) (Quadro 1); um sítio de clivagem extra está presente na ORF1 dos SaV, para os quais a VP1 está na mesma fase de leitura.

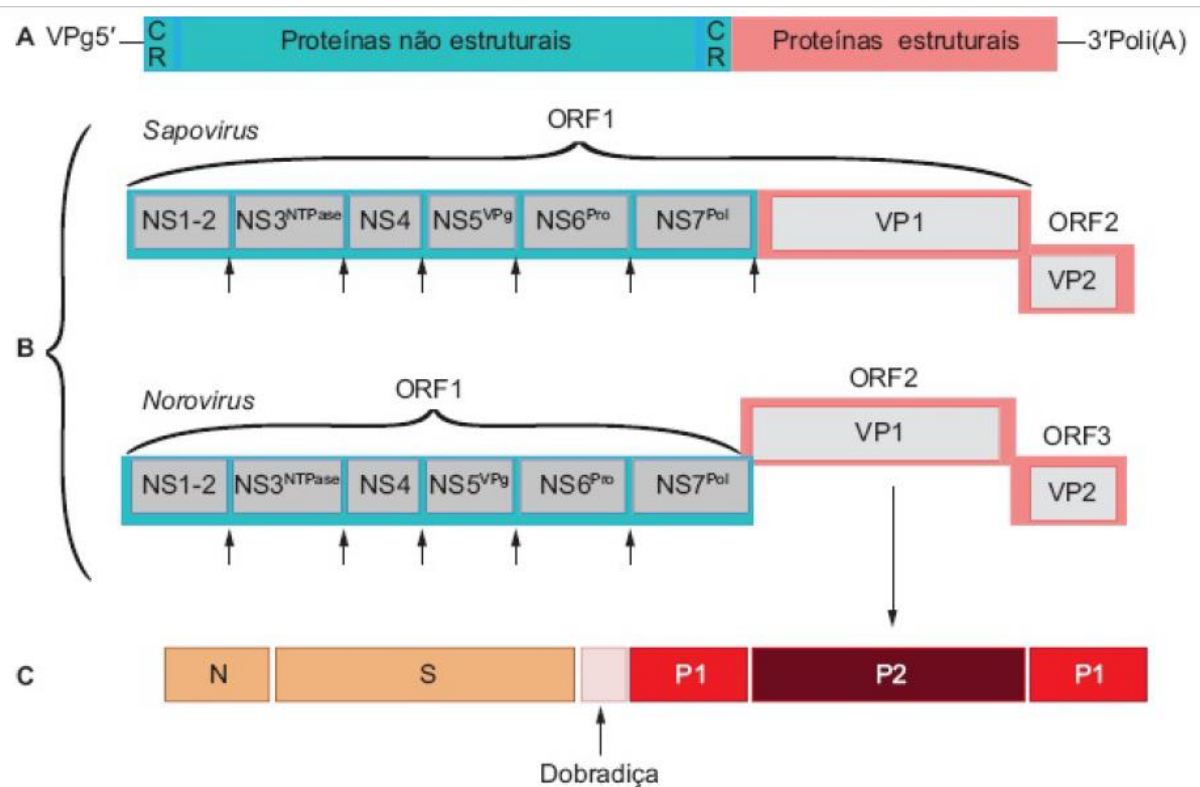


Figura 1.2: Estrutura e organização genômica dos calicivírus.

A. Organização genômica – o RNA de fita positiva mede entre 7,3 e 8,5 kb, é covalentemente ligado a uma proteína viral (VPg) na terminação 5' e é poliadenilado (poli(A)) na terminação 3'. CR: sequência nucleotídica conservada. B. Estrutura genômica dos norovírus (NoV) e sapovírus (SaV). Setas: domínios de clivagem para 7 proteínas não estruturais (NS1-NS7); um sítio de clivagem extra está presente na ORF1 dos SaV, para os quais a VP1 está na mesma fase de leitura. C. Organização da VP1 dos NoV. Fonte: Adaptado de Soares CC, *Calicivirus e Astrovirus*. In Santos NOS, Romanos MTV, Wigg MD. *Virologia humana* 3. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 466 – 479.

Proteínas	Tamanho (kDa)	ORF	Função	Comentário
NS1/NS2	37 – 41	ORF1	Desconhecida	NS1/NS2 é clivada em 2 peptídeos em algumas estirpes de NoV e SaV
NS3	40 – 41	ORF1	NTPase	Sequência homóloga à RNA helicase, liga e hidrolisa NTP*
NS4	19 – 32	ORF1	Desconhecida	Análoga da proteína 3A dos picornavírus
NS5	14 – 16	ORF1	VPg	Liga-se a fatores celulares de iniciação da tradução de proteínas
NS6	13 – 19	ORF1	Cisteíno-protease	Medeia a clivagem da poliproteína codificada pela ORF1
NS7	57	ORF1	RpRd	Pode também ter atividade de protease na forma do precursor NS6/NS7 nos NoV
VP1	58 – 60	ORF1 (SaV) ORF2 (NoV)	Principal proteína do capsídeo	180 cópias por vírion
VP2	12 – 29	ORF2 (SaV) ORF3 (NoV)	Componente minoritário do capsídeo	1 a 2 cópias por vírion

Quadro 1: Proteínas dos calicivírus, com suas funções, localizações e tamanho.

Fonte: Adaptado de Soares CC, Calicivirus e Astrovirus. In Santos NOS, Romanos MTV, Wigg MD. *Virologia humana* 3. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 215 – 221.

A ORF2 dos NoV codifica para principal proteína estrutural, VP1, contendo de 530 a 555 aminoácidos (aa) com 58 – 60 kDa de massa molecular. O capsídeo viral é composto por 180 monômeros de VP1, que se unem formando 90 dímeros. A VP1 é dividida em dois domínios denominados S (*shell*), região mais conservada, e P (*protruding*), região mais variável, que são ligados por uma “alça” ou “dobradiça” (*hinge*). No domínio S (aa 1 a 225), região intermediária, está localizada o braço N-terminal, que é a região mais interna do capsídeo. O domínio P (aa 226 a 520) é dividido em dois subdomínios denominados P1, que está compreendido entre os aa 226 – 278 e 406 – 520 e P2 que está compreendido entre os aa 279 a 405. O subdomínio P2 é considerado uma região hipervariável, por estar localizado na

superfície mais externa do capsídeo viral (Figura 1.3) (Prasad et al., 1999; Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). A ORF3 codifica para uma proteína estrutural menor denominada VP2 de 208 – 268 aa e 22 – 29 kDa de massa molecular. Sua função no ciclo de replicação ainda não é clara, porém sabe-se que essa proteína está presente em uma ou duas cópias por vírion. Estudos sugerem que essa proteína possa estar envolvida no empacotamento do RNA viral (Glass et al., 2000b; Hardy, 2005).

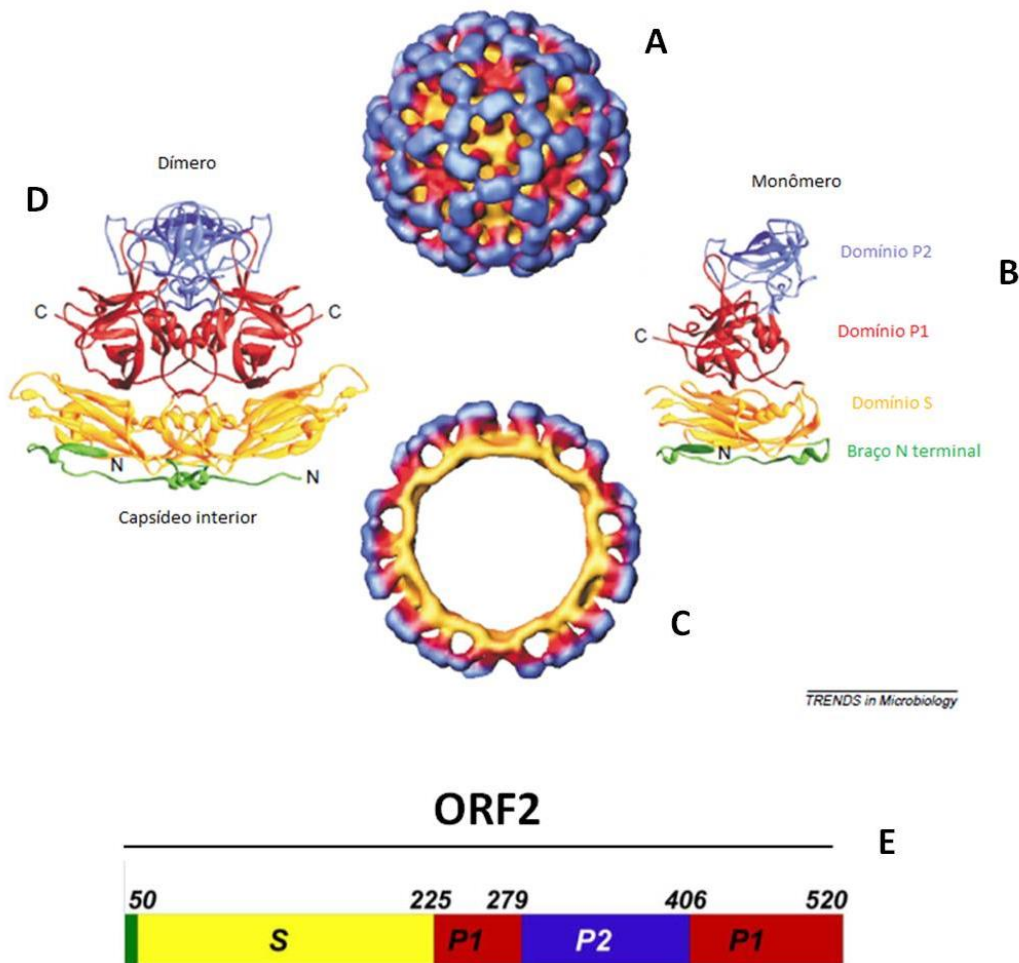


Figura 1.3: Representações da estrutura do capsídeo viral e da ORF2 dos norovírus.

ORF: Open reading frame; S: domínio S; P1: subdomínio P1; P2: subdomínio P2. Representações da partícula: superfície viral (A). Proteína monomérica do capsídeo (B), dividida em uma região N-terminal (verde) de frente para o interior da VLP; um domínio Shell (Domínio S, amarelo) que forma a superfície contínua da VLP; um domínio saliente (Domínio P), que emana da superfície do domínio S. O domínio P encontra-se dividido em subdomínios P1 e P2 (vermelho e azul, respectivamente) com o subdomínio P2 na superfície mais distal da VLP. Corte transversal e fundo da partícula viral (C). Dímeros da proteína do capsídeo (D) montados em simetria icosaédrica. Representação esquemática das posições dos domínios S, P1 e P2 na ORF2 (E). Adaptado de Hutson et al., 2004 e Hardy, 2005.

1.3 Propriedades físico-químicas

Os CaV têm capacidade de flutuação em cloreto de céσιο de 1,33 a 1,41 g/cm³ (Cubitt et al., 1979; Suzuki et al., 1979). Os NoV permanecem infecciosos após tratamento com desinfetantes, comumente utilizados, como alcoóis e compostos quaternários de amônio, assim como após aquecimento a uma temperatura de 60°C por 30 minutos, a éter 20% por 18 horas a 4 °C e quando expostos a pH 2,7 por três horas a temperatura ambiente (Dolin et al., 1972). Também são resistentes à inativação após tratamento com 3,75 a 6,25 mg/L de cloro (resíduo de cloro livre de 0,5 a 1,0 mg/L), concentração a qual é encontrada em sistemas de distribuição de água para consumo. Entretanto, as partículas de NoV são inativadas após tratamento com 10 mg/L de cloro. Estudos demonstram que os NoV são mais resistentes a inativação por cloro do que poliovírus tipo 1, rotavírus humanos (Wa), rotavírus simion (SA11) e de bacteriófago F2 (Green et al., 2007).

Estudos realizados com SaV suíno demonstram estabilidade a pH 3,0 a 8,0, à temperatura ambiente durante 1 h, sensibilidade ao tratamento com etanol (60% e 70%) à temperatura ambiente durante 30 s, inativação por 200 mg/L (ou ppm) de hipoclorito de sódio à temperatura ambiente durante 30 min e por aquecimento a 56 ° C durante 2 h (Wang et al., 2012).

1.4 Classificação

Os gêneros *Norovirus* e *Sapovirus* são classificados de acordo com o grau de diferença dos aminoácidos (aa) da VP1 (Katayma et al., 2004; Hansman et al., 2005; Oka et al., 2006; Zheng et al., 2006). Ambos os gêneros apresentam classificação em genogrupos (G) e genótipos de acordo com o percentual de variação entre os vírus, sendo a nomenclatura tradicional baseada na combinação genogrupo-genótipo (por exemplo, GII.4).

1.4.1 Norovírus

Utilizando o método de distância de bases sem correção, os genogrupos dos NoV apresentam diferença de aminoácidos (aa) variando entre 45 a 61% (Zheng et

al., 2006). Atualmente, o gênero é dividido em seis genogrupos (GI – GVI), com a proposta de um sétimo (GVII) ainda em andamento (Martella et al., 2008; Tse et al., 2012). Os genogrupos são subdivididos em genótipos (diferença entre 14 a 44% da sequência aa da VP1) e em estirpes (0 a 14% de diferença) (Zheng et al., 2006). Membros dos GI, GII e GIV são descritos infectando humanos, com exceção dos GII.11, GII.18 e GII.19 que têm origem suína e GIV.2 que tem origem canina. Até o momento, 29 genótipos de NoV humanos foram descritos, dos quais 9 pertencem ao GI, 19 ao GII e um ao GIV (Vinjé et al., 2015).

Duas regiões do genoma dos NoV são utilizadas para classificar as estirpes: a região localizada na ORF1, a qual codifica para a polimerase e a localizada na ORF2, a qual codifica para a VP1. A diversidade genética e os frequentes eventos de recombinação entre as ORF1 e ORF2 têm resultado em topologias filogenéticas que, apesar de similares, não são idênticas, como mostrado nas árvores de máxima verossilhança da ORF1 (Figura 1A) e ORF2 (Figura 1B). Devido à ocorrência destas recombinações, uma nomenclatura binária utilizando ambas as sequências da polimerase e VP1 tem sido proposta. Neste novo sistema de nomenclatura, foi proposto a adição da letra “P”, para a designação de sequências provenientes da região da polimerase. Por exemplo, um isolado do genogrupo II que tenha agrupamento no genótipo 4 pela ORF1 e agrupamento no genótipo 3 pela ORF2 (capsídeo) será nomeado conjuntamente GII.P4_GII.3 (Kroneman et al., 2013). Importante notar que a nomenclatura dos genogrupos GIV, GVI e GVII não são consistentes: GIV e GVI foram inicialmente classificados como um único genogrupo, o qual era reconhecido como GIV, e as estirpes dos GVII também foram classificadas no passado como pertencentes ao GVI (de Graaf et al., 2016).

Devido à grande diversidade genética e um padrão de sazonalidade diferenciado em relação aos outros genótipos descritos, o GII.4 tem sido subclassificado, nos últimos 10 anos, em variantes (Siebenga et al., 2007a). Foi proposto que uma variação superior a 5% na sequência aminoacídica da VP1 pode determinar uma nova variante (Zheng et al., 2010). Estas são nomeadas de acordo com o ano e/ou local onde foram isoladas, sendo as principais variantes pandêmicas descritas até o momento as US_95/96, Farmington Hills_2002, Hunter_2004, Yerseke_2006a, Den Haag_2006b, New Orleans_2009 e Sydney_2012 (de Graaf et al., 2016).

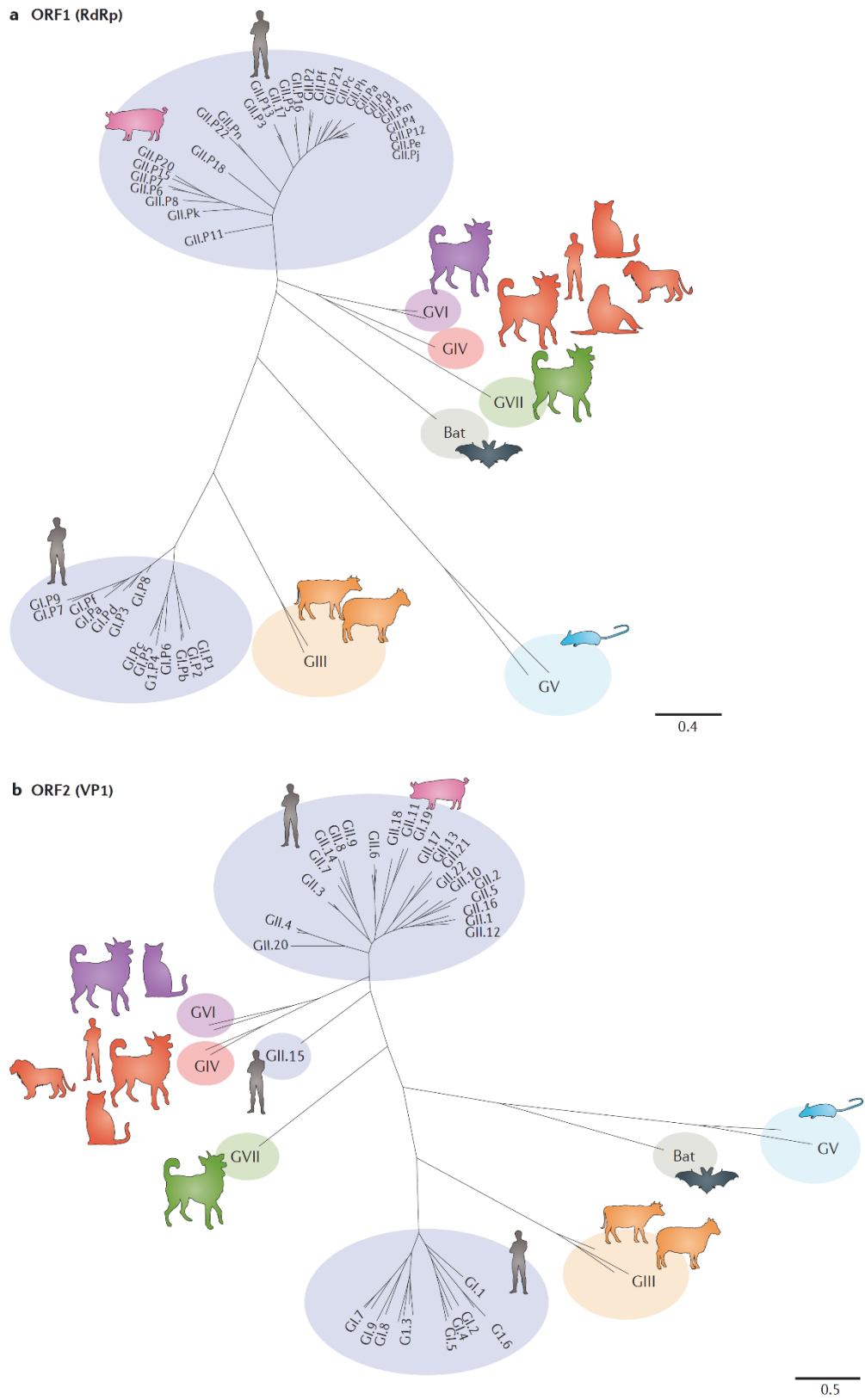


Figura 1.4: Classificação dos norovírus baseada nas árvores filogenéticas das sequências das ORF1 (RdRp) e ORF2 (VP1).

A escala representa o número de substituições nucleotídicas por sítio. Adaptado de de Graaf et al., 2016.

1.4.2 Sapovírus

Os SaV são divididos em cinco genogrupos (GI a GV) (Farkas et al., 2004; Oka et al., 2012; 2015), e nove adicionais (GVI a GXIV) têm sido propostos (Scheuer et al., 2013). Até o momento, os SaV humanos foram classificados em quatro genogrupos (GI, GII, GIV e GV). Oka e colaboradores (2012) estabeleceram um sistema de classificação dos SaV humanos o qual propõe a classificação em estirpes quando valores de distância entre pares de base for entre 0 – 15.9%, em genótipos 19.8 – 47.1% e em genogrupos 52.2 – 80.7%. Com base nestes critérios, os GI e GII foram subdivididos em sete genótipos (GI.1 – GI.7 e GII.1 – GII.7). GIV apresentou um único genótipo (GIV.1) e GV foi subdividido em dois genótipos (GV.1 e GV.2). GV inclui ainda SaV detectados a partir de suínos (GV.3) e leões marinhos (GV.4).

Sequências parciais de regiões da polimerase e da VP1 podem ser utilizadas para caracterizar os SaV detectados, bem como para analisar a sua similaridade em estudos epidemiológicos (Kitajima et al. 2010a; 2011; Bucardo et al., 2014; Liu et al., 2015). Em contraste, a região de junção de RdRp – VP1, que é geralmente utilizada para detecção por PCR em tempo real, é muito curta para tal análise. O ICTV estabelece que para designação de novos genótipos e genogrupos seja realizado o sequenciamento completo da VP1.

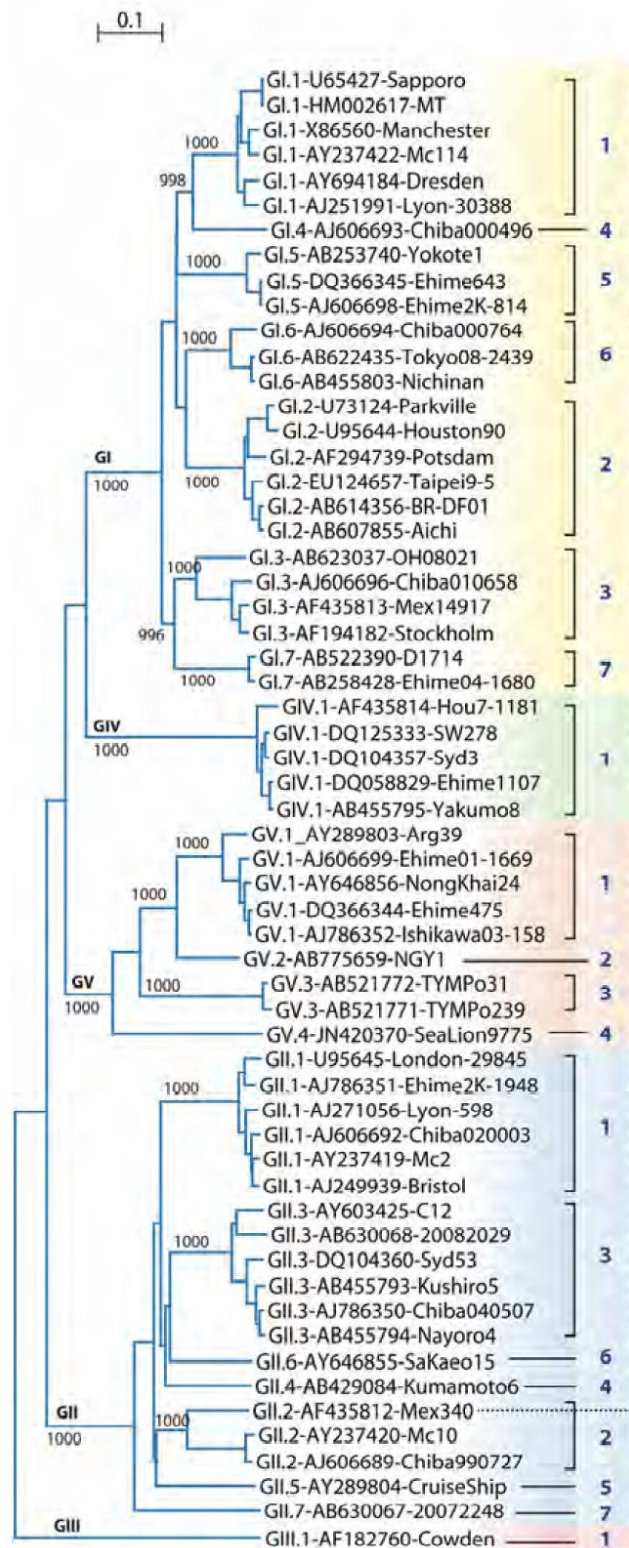


Figura 1.5: Árvore filogenética de sapovírus baseada na sequência nucleotídica completa da VP1 com a classificação dos genogrupos I, II, III, IV e V e seus respectivos genótipos.

A escala representa o número de substituições nucleotídicas por sítio. Adaptado de Oka et al., 2015.

1.5 Manifestações clínicas e patogenia

As principais manifestações clínicas observadas na infecção por CaV humanos são vômito e diarreia podendo vir acompanhadas por febre, dores abdominais, náuseas e cefaleia. A infecção ocorre por via oral e o período de incubação varia de 10 a 51 h, com média de 24 h. A resolução dos sintomas geralmente ocorre entre um e quatro dias em indivíduos imunocompetentes (Thornton et al., 2004). Cerca de 30% das infecções por NoV são assintomáticas. Nestes casos, a eliminação dos vírus ocorre em títulos inferiores quando comparados pela excreção de indivíduos sintomáticas (Graham et al., 1994; Phillips et al., 2009). Infecção assintomática por SaV também tem sido demonstrada (Chiba et al., 1979; Matson et al., 1990; Bucardo et al., 2012), entretanto análises quantitativas por PCR demonstram que indivíduos assintomáticos excretam SaV nas fezes em níveis comparáveis a de sintomáticos (Yoshida et al., 2009; Kobayashi et al., 2012). Em geral, a gravidade da GA por SaV é mais branda em relação a dos NoV (Pang et al., 2000; Rockx et al., 2002; Sakai et al., 2001). A infecção por NoV está associada a complicações clínicas mais graves em grupos mais suscetíveis (recém-nascidos prematuros e pacientes imunocomprometidos) (Bok et al., 2012; Frange et al., 2012; Naing et al., 2013). Os NoV representam um maior agravo em crianças menores de cinco anos e pessoas idosas devido ao risco aumentado de desidratação. Em imunocomprometidos a infecção pode apresentar duração prolongada e a excreção permanecer por anos (Gallimore et al., 2004; Roos-Weil et al., 2011; Green 2014). A eliminação prolongada de NoV, tanto em pacientes crônicos sintomáticos quanto assintomáticos, representa um risco à saúde pública por aumentar as chances de contaminações e surtos nosocomiais e por propiciar a geração de uma grande diversidade da população viral intra-hospedeiro (Sukhrie et al., 2010; Bull et al., 2012).

Devido à dificuldade em se estabelecer um sistema de cultivo celular e um modelo animal para propagação dos CaV humanos, o conhecimento a respeito da patogênese da infecção destes vírus tem sido gerado por estudos histológicos, bioquímicos e físicos em voluntários humanos e por estudos com NoV murino (GV) ou outros CaV de animais capazes de se propagarem em cultivo celular (Bhella et al., 2008; Perry et al., 2010).

A dose infecciosa (DI) dos NoV pode variar para diferentes estirpes, com estimativas variando de 18.2 (Teunis et al., 2008) a 1320 – 2800 partículas (Atmar et al., 2014). Especula-se que os SaV também possam ter baixa dose infecciosa

(semelhante a dos NoV), no entanto estudos com voluntários são necessários para confirmar esta consideração.

A infecção por NoV resulta em alterações histológicas de curta duração e de intensidade média na morfologia da mucosa intestinal, onde são observados aumento e embotamento das vilosidades, encurtamento dos microvilos, vacuolização citoplasmática, edema intracelular e apoptose dos enterócitos. Também se observa uma infiltração inflamatória em direção à lâmina própria, assim como um aumento de células T citotóxicas intraepiteliais no duodeno. O influxo de linfócitos T CD8+ (citotóxicas) é indicativo de um mecanismo direto para promoção da apoptose via liberação de perforinas (Blacklow et al., 1972; Schreiber et al., 1973; 1974; Troeger et al., 2009).

1.6 Ciclo replicativo

A estratégia de replicação dos NoV e SaV compartilha muitas características de outros vírus RNA de polaridade positiva, sendo o ciclo replicativo descrito baseado na replicação do CaV felino (Green et al., 2007). O vírus entra na célula hospedeira via receptores específicos, e posteriormente o genoma é liberado no citoplasma (Kreutz et al., 1994; Maeda et al., 2002), onde a iniciação da tradução é mediada pela interação da proteína VPg à maquinaria celular (Gutierrez-Escolano et al., 2000; Daughenbaugh et al., 2003; Goodfellow et al., 2005). A ORF1 é traduzida em uma poliproteína, que é clivada durante e após a tradução em proteínas não estruturais (e a estrutural VP1, no caso dos SaV) pela 3Clíke protease (3CLpro) (Sosnovtsev et al., 2002). As ORF2 e 3 dos NoV são traduzidas nas proteínas estruturais VP1 e VP2, respectivamente, a partir dos RNAs genômico e subgenômico (Hardy 2005).

A replicação do RNA viral está associada à membrana celular da célula hospedeira, assim como todos os outros vírus de RNA de polaridade positiva (Green et al., 2007). A síntese da fita de RNA de polaridade negativa a partir do RNA genômico se inicia no final desta a partir da extremidade 3', a fita anti-senso tem como função servir como molde para a síntese do RNA genômico e subgenômico de polaridade positiva (Neill et al., 1998; Gutierrez-Escolano et al., 2003). O mecanismo de empacotamento, maturação e liberação das partículas virais de NoV e SaV ainda não estão esclarecidas (Green et al., 2007).

Os antígenos de grupo histo-sanguíneo (HBGAs), que são expressos na superfície de células epiteliais de mucosas, têm sido indicados como os principais receptores para os NoV. Os HBGAs são carboidratos neutros ligados a proteínas ou lipídeos na superfície celular. As enzimas fucosiltransferases (FUT 1, 2 e 3), que controlam a síntese de HBGAs são codificadas pelas famílias de genes polimórficos ABO, secretor e Lewis, respectivamente. Essas três famílias contêm alelos silenciosos, que podem resultar em fenótipos nulos em seus *loci*. Indivíduos contendo o gene selvagem FUT2, denominados secretores, são suscetíveis à infecção por NoV, enquanto indivíduos com o alelo nulo FUT2, não-secretores, são resistentes à infecção (Lindesmith et al., 2003). Um número distinto de perfis de ligação específicos para cada estirpe tem sido descrito, de modo que estes vírus podem infectar quase todos os indivíduos devido a sua alta variabilidade genética. Esses dados ressaltam a natureza adaptativa e provavelmente de uma longa co-evolução dos NoV humanos e seu hospedeiro (Karst 2010).

Em relação aos SaVs, nenhum fator genético ligado ao hospedeiro tem sido associado a suscetibilidade ou resistência a infecção e doença causada por esses vírus. (Bucardo et al., 2012). Recentemente foi descrito que resíduos de ácido siálico atuam como receptores funcionais para SaV suíno (Kim et al., 2014).

1.7 Imunidade

A imunidade aos CaV é complexa e pouco compreendida devido às respostas heterogêneas na população humana e à natureza transitória da imunidade em alguns indivíduos. Estudos realizados em voluntários humanos revelaram que aproximadamente 50% dos adultos desenvolveram a doença após o desafio com NoV. Esses resultados demonstram um elevado grau de suscetibilidade à doença induzida tanto de forma natural quanto experimental (Blacklow et al., 1972; Wyatt et al., 1974).

Dados provenientes de desafios em voluntários humanos e de surtos de NoV ocorridos naturalmente na população demonstram que os indivíduos desenvolvem anticorpos específicos e que a presença dessa resposta não está correlacionada a proteção. A imunoglobulina de classe G (IgG) sérica vírus-específica é induzida e persiste por meses após a infecção, enquanto IgA e IgM são de curta duração (Parrino et al., 1977; Johnson et al., 1990; Graham et al., 1994; Lindesmith et al., 2003).

Estudos com anticorpos séricos demonstram que anticorpos da classe IgG contra NoV são genogrupo-específicos, embora ocorra reatividade cruzada inter-genótipos pelo cruzamento da resposta contra estirpes heterólogas dentro do mesmo genótipo (Rockx et al., 2005b; Cannon et al., 2009; Reeck et al., 2010; Lindesmith et al., 2010, 2011).

Atualmente, não existe nenhum modelo animal o qual reproduza diretamente a gama de sintomas da doença observada em humanos. Entretanto evidências de infecção por NoV humanos têm sido demonstradas em bezerros, leitões gnobióticos, chimpanzés e macacos (Rockx et al., 2005a; Cheetham et al., 2006; Souza et al. 2007; 2008; Bok et al., 2011). A ausência de cultura celular para NoV humanos inviabiliza a determinação da capacidade neutralizante dos anticorpos específicos para NoV, assim como a duração de sua resposta. Deste modo, é possível que o declínio da imunidade humoral esteja relacionada à suscetibilidade de indivíduos previamente expostos terem repetidas infecções por NoV (Karst 2010).

Tem sido sugerido que os NoV podem propiciar imunidade coletiva, baseando-se no padrão de pandemias dos NoV GII.4 em intervalos de 2 a 4 anos, com a emergência de uma estirpe de vírus dominante, substituindo a anterior. Esta emergência de novas variantes GII.4 pandêmicas é postulada como resultado de *drift* antigênico mediado pela alteração do uso de carboidrato ou da antigenicidade, facilitando o escape da imunidade coletiva (Lindesmith et al., 2003; Cannon et al., 2009, Siebenga et al., 2009).

A imunidade coletiva de curta duração resulta na evolução da emergência de estirpes de NoV, mas o declínio desta imunidade com o passar do tempo, possibilita que indivíduos geneticamente suscetíveis possam ser repetidamente infectados com vírus homólogos durante um período longo. As variantes 2002 – 2005 de NoV GII.4 apresentam perfis de ligação a receptores distintos quando comparados com os das variantes 1974 – 1997, enquanto o perfil de ligação da variante de 2006 é similar com o das variantes 1974 – 1997 (Donaldson et al., 2008; Bok et al., 2009).

Os estudos de soroprevalência de SaV humanos usando vírus purificado ou proteínas do capsídeo recombinantes demonstram que a taxa de soroprevalência aumenta gradualmente com a idade, podendo atingir um nível elevado (> 90%) em crianças em idade escolar, e mantendo-se elevada (80 a 100%) no soro de adultos (Sakuma et al., 1981; Nakata et al., 1985; 1998; Cubitt et al., 1987; Farkas et al., 2006). Estes resultados sugerem que infecção por SaV é comum durante a primeira infância.

Mecanismos de proteção por imunidade/resistência a infecção por SaV no local da infecção primária provável (por exemplo, lúmen intestinal) ainda necessitam ser esclarecidos, entretanto a presença de anticorpos anti-SaV pré-existentes no soro tem sido associada a frequências reduzidas de infecção e doença, pelo menos para os anticorpos anti-SaV antigenicamente homólogos (Nakata et al., 1985). Recentemente um estudo no Japão demonstrou a ocorrência de reinfecções sintomáticas com genogrupo/genótipo de SaV diferentes (Harada et al., 2013).

1.8 Epidemiologia

1.8.1 Transmissão

A excreção de CaV nas fezes de indivíduos infectados pode continuar depois que os sintomas desaparecem (Suzuki et al., 1979; Chiba et al., 1980), entretanto a carga viral diminui gradualmente após o início da doença (Iwakiri et al., 2009), podendo variar de 10^5 a 10^{12} cópias genômicas/grama de fezes durante o pico de excreção (Hansman et al., 2007c; Wu et al., 2008; Teunis et al., 2008; Harada et al., 2012; Atmar et al., 2014).

Os surtos de GA provocados por NoV são relatados principalmente em lugares com grandes aglomerações como cruzeiros marítimos (Wikswa et al., 2011), acampamentos militares (Bailey et al., 2008; Wadl et al., 2010), hospitais (Georgiadou et al., 2011), asilos (Lin et al., 2011), creches (Ferreira et al., 2012), escolas e universidades (CDC, 2009).

Surtos de NoV podem ocorrer durante todo o ano, embora se observe diferentes padrões de sazonalidade nos hemisférios norte e sul. Diversos estudos demonstram a ocorrência destes vírus em meses mais frios e secos do ano em países de clima temperado (Hale et al., 2000; Mounts et al., 2000; Green et al., 2002). Entretanto, em países de clima tropical, esse padrão de sazonalidade não é muito bem definido, sendo relatados aumentos de frequência dos NoV em diferentes meses do ano (Borges et al., 2006; Soares et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; de Andrade et al., 2014; Fumian et al., 2016).

Embora o número de surtos de SaV relatados sejam menores em relação aos NoV (Hedlund et al., 2000; Blanton et al., 2006; Hall et al., 2013), surtos ocorrem durante todo o ano em diversas localidades, como por exemplo creches, escolas,

faculdades, hospitais, lares, restaurantes, hotéis, salões de festas e navios (McSwiggan et al., 1978; Cubitt et al., 1980; Hansman et al., 2007c; Pang et al., 2009; Yoshida et al., 2009; Mikula et al., 2010; Miyoshi et al., 2010; Svraka et al., 2010; Yamashita et al., 2010; Lee et al., 2012).

Em relação à sazonalidade, semelhante aos NoVs, (Phan et al., 2004; Harada et al., 2009, Pang et al., 2000; 2014), os SaVs são detectados mais frequentemente nas estações mais frias do ano em países do hemisfério norte, como por exemplo Japão, EUA, Reino Unido, Dinamarca e Canadá (Harada et al. 2009; Dey et al. 2012; Lee et al. 2012), embora diferentes picos sazonais durante o ano também tenham sido relatados (Nakata et al., 1998, Pang et al., 2000). Em contrapartida, estudos realizados na África do Sul (Page et al., 2016), Malawi (Dove et al., 2005) e Quênia (Nakata et al., 1998) os SaV foram detectados durante todo ano, com pequenos picos durante o verão e outono.

A transmissão dos CaV ocorre por meio das vias fecal-oral e vômito-oral por quatro rotas gerais: contato direto pessoa-pessoa, alimentícia, hídrica ou através de fômites. A contaminação alimentar ocorre tipicamente por manipuladores de alimentos infectados durante o processo de preparo ou também durante o processo de distribuição do alimento. Diversos estudos relatam surtos de GA por NoV ocorridos pelo consumo de frutas vermelhas (Le Guyader et al., 2004; Sarvikivi et al., 2012), moluscos bivalves (Gunn et al., 1982; Baker et al., 2011) e saladas (Vivancos et al., 2009) contaminadas. A utilização de água contaminada para recreação ou consumo pode resultar em surtos de larga escala (Beller et al., 1997; Kukkula et al., 1999; Hewitt et al., 2007). Um estudo realizado na Europa demonstrou que 88% dos surtos de GA por NoV foram devido ao contato pessoa-pessoa, 10% por alimentos contaminados e 2% por água contaminada (Kroneman et al., 2008). Nos últimos anos dados da literatura têm relacionado um aumento de surtos de NoV em consequência de alimentos contaminados. As principais causas desse aumento são o crescimento do mercado global de vegetais, frutas e carnes, dos quais são originários de países que não possuem procedimentos microbiológicos seguros assim como uma mudança nos hábitos alimentares, como o consumo de alimentos crus ou levemente cozidos (Newell et al., 2010). Surtos de origem alimentar com suspeita de SaV também são relatados (Usuku et al., 2008; Iizuka et al., 2013; Iritani et al., 2014). O maior surto de origem alimentar por SaV (n = 665 pessoas) ocorreu no Japão em 2010 (Kobayashi et al., 2012). Uma investigação epidemiológica apontou que a fonte de contaminação foi

proveniente de lanches de caixa prontos, os quais tinham sido preparados por manipuladores infectados.

Se um dos efeitos do desenvolvimento econômico de um país é o melhor saneamento e higiene, este deveria coincidir com uma menor incidência de doenças de transmissão hídrica, alimentar e ambiental, e possivelmente com uma maior frequência da doença causada pelo contato direto pessoa-pessoa. Desta forma, os indivíduos que vivem em países onde o saneamento e higiene são inadequados, provavelmente ocorrerá uma maior exposição aos NoVs por múltiplas rotas. Esta noção de transmissão é consistente com uma maior incidência da doença na faixa etária mais jovem da população (Shioda et al., 2015) assim como mais casos de reinfecção assintomática em países em desenvolvimento (Lopman et al., 2014).

1.8.2 Faixa etária

Os NoVs infectam pacientes de todas as idades, uma característica que os difere de outros vírus gastrentéricos, como os RVA, os astrovírus e os adenovírus entéricos, que infectam preferencialmente crianças menores de 5 anos (Glass et al., 2000a). Estimativas populacionais em países desenvolvidos indicam uma incidência de doença por NoV em indivíduos de todas as faixas etárias variando entre 3.8 a 10.4% por ano (Karsten et al., 2009; Hall et al., 2011; Scallan et al., 2011; Verhoef et al., 2013). Isto significa que, baseado em uma expectativa de vida de 80 anos, uma pessoa deverá sofrer de três a oito episódios de GA associada a NoV durante sua vida, dos quais pelo menos um deverá ocorrer até os cinco anos de idade (Phillips et al., 2010). A mortalidade em crianças menores de 5 anos pode variar de 71 mil (em 2011 [Lanata et al., 2013]) a 212.000 (em 2004 [Patel et al., 2008]). Nesta faixa etária, os NoVs representam a terceira causa etiológica mais comum de mortalidade por diarreia, atrás dos RVA e *Escherichia coli* enteropatogênica (Lanata et al., 2013).

A doença por SaV ocorre com mais frequência em crianças menores de cinco anos, entretanto estes vírus também são detectados em crianças mais velhas, adultos e idosos (Rockx et al., 2002, de Wit et al., 2001; Yoshida et al. 2009; Svraka et al. 2010; Lee et al. 2012 Pang et al., 2014). Os índices de detecção de SaV na população sintomática são, geralmente, menores que os de NoV, podendo variar de 1,4% a 19,2% (Harada et al., 2009; Svraka et al., 2010; Lee et al., 2012; Trang et al., 2012).

1.8.3 Distribuição geográfica

É estimado que os NoV estejam associados a pelo menos 18% de todos os casos de doença diarreica no mundo. Esta percentagem é mais elevada em casos de comunidade (24%), do que casos ambulatoriais (20%) ou hospitalares (17%) (Ahmed et al., 2014).

A maioria dos estudos de vigilância epidemiológica demonstram o GII como o mais prevalente entre os NoV detectados em humanos e mais frequentemente associado com epidemias e casos esporádicos, quando comparado ao GI (Noel et al., 1999; Victoria et al., 2007; Ferreira et al., 2008; Bull et al., 2010; Fioretti et al., 2011; de Andrade et al., 2014). A circulação de NoV GIV é pouco estudada, sendo sua prevalência e epidemiologia molecular pouco conhecida. Alguns estudos demonstram este genogruppo presente em amostras fecais provenientes de indivíduos com GA nos Estados Unidos (Fankhauser et al., 2002), na Itália (La Rosa et al., 2008) e no Japão (Iritani et al., 2002).

Em relação à prevalência de génotipos, o NoV GII.4 tem sido descrito como o mais prevalente desde meados da década de 1990, sendo responsável por grande parte dos surtos e de casos esporádicos de GA no mundo (Noel et al., 1999; Lopman et al., 2004; Lindesmith et al., 2008; Patel et al., 2008). Períodos epidémicos causados por GII.4 estão associados com a entrada de novas variantes antígenicamente distintas das anteriores. O fenómeno de emergência e substituição de variantes de NoV GII.4 geralmente ocorre em intervalos de 2 a 4 anos e tem sido observado em todos os continentes (Siebenga et al., 2007a). Em 1995/1996 um aumento significativo de surtos de NoV foi registrado na Austrália, Europa e EUA, sendo a estirpe 95/96_US identificada como o principal génotipo entre os NoV (Fankhauser et al., 1998, Wright et al., 1998). Em 2002, surtos de gastroenterite aguda associados à NoV atingiram níveis sem precedentes em vários países do mundo. Estudos posteriores demonstraram a emergência de uma nova variante de GII.4, o vírus Farmington Hills_2002 (Lopman et al., 2004; Dingle, 2004; Widdowson et al., 2004). No início de 2004, uma terceira estirpe pandémica emergiu, sendo nomeada Hunter_2004. Em 2006 um novo aumento de surtos por NoV foi associado à emergência de duas variantes: Yerseke_2006a e Den Haag_2006b. A primeira emergiu a partir da estirpe da Hunter_2004, enquanto a segunda emergiu da Farmington Hills_2002. Até o ano de 2004, cada nova variante emergente descendia da variante anterior circulante, o que não ocorreu com a Den Haag_2006b (Bull et al., 2006; Siebenga et al., 2009;

Motomura et al., 2010). As duas últimas emergências de variantes foram descritas em 2009 e 2012, sendo nomeadas New Orleans_2009 e Sydney_2012, respectivamente. (Vega et al., 2011; Yen et al., 2011). Outras variantes como 2001, 2002CN, 2003, 2007 e 2008 foram detectadas circulando ao longo desses anos em alguns continentes, entretanto não apresentaram características pandêmicas (Larsson et al., 2006; Okada et al., 2006; 2007; Motomura et al., 2010).

Essa alternância entre períodos de grande número de surtos com posterior diminuição pode indicar a obtenção de imunidade coletiva na população. Essa pressão imunogênica tem sido relacionada como um importante regulador da evolução dos NoV GII.4 (Buesa et al., 2002; Adamson et al., 2007; Okada et al., 2007; Siebenga et al., 2007a; 2007b; Lindesmith et al., 2008; Johansen et al., 2008; Tu et al., 2008; Donaldson et al., 2010; Boon et al., 2011).

Análises por ferramentas de bioinformática têm demonstrado que GII.4 apresenta elevada taxa de mutação e capacidade evolutiva, o que provavelmente facilita o surgimento de estirpes antigenicamente divergentes (Bull et al., 2010). É evidenciado que mutações no subdomínio P2 do capsídeo viral, que contém o sítio de ligação com antígeno celular HBGA, combinado com a expansão da população suscetível pode ser responsável pela emergência de variantes pandêmicas (Donaldson et al., 2010; Lindesmith et al., 2011). A imunidade coletiva de curta duração contra os NoV impulsiona a evolução de estirpes emergentes, contudo o declínio desta possibilita que indivíduos suscetíveis possam ser reinfetados com vírus homólogos (Bull & White 2011).

Estudos de epidemiologia molecular em diferentes regiões do mundo demonstram que algumas linhagens de GII.4 isolados em uma determinada região geográfica são capazes de causar epidemias disseminadas, no entanto, são geograficamente limitadas (Siebenga et al., 2009). O fracasso dessas linhagens GII.4 epidêmicas espalharem globalmente pode ser devido às diferenças na genética e o microbioma do hospedeiro ou diferenças na exposição prévia de NoV nestas populações (de Graaf et al., 2016).

Uma comparação da evolução de estirpes de genótipos não-GII.4 e estirpes GII.4 sugere que as primeiras estão sujeitas a uma menor pressão adaptativa. Apesar de ser menos prevalente do que as GII.4, estirpes GII.3 são frequentemente detectadas em amostras de pacientes, particularmente em crianças, e evoluem a uma taxa de $4,16 \times 10^{-3}$ substituições de nucleotídeos por sítio por ano (subst/sítio/ano), o que é semelhante à taxa de evolução de estirpes pertencentes ao GII.4 e GI (Boon et

al., 2011; Kobayashi et al., 2015). No entanto, apesar das taxas de substituição nucleotídica semelhantes, a acumulação de mutações de aminoácidos é muito menor para as estirpes GII.3 do que para GII.4 (Boon et al., 2011), o que é indicativo de uma pressão imunogênica mais limitada nas estirpes GII.3.

Recentemente, os principais surtos de GA por NoV ocorridos em algumas regiões da Ásia têm sido associados a estirpe recém-surgida GII.P17_GII.17, onde pôde-se observar a substituição da variante Sydney_2012 GII.4 anteriormente circulante. Embora o genótipo GII.P17_GII.17 também tenha sido detectado em casos de GA na Europa, Estados Unidos e Austrália, ainda não foi observada a substituição da Sydney_2012 nessas regiões (de Graaf et al., 2015).

Enquanto o impacto dos NoVs tem sido extensivamente estudado, a vigilância epidemiológica para SaV é menos avançada (Oka et al., 2015). Estes vírus são importantes agentes etiológicos de surtos e casos esporádicos de GA, sendo demonstrado circulando em diferentes regiões do mundo (Svraka et al., 2010; Dey et al., 2012; Tam et al., 2012; Hassan-Rios et al., 2013). Dados de estudos apontam os SaV como causa de 1,3 – 8,0% dos surtos de GA (Hedlund et al., 2000; Blanton et al., 2006; Iritani et al., 2014). Outros demonstram taxa de positividade variando entre 5,9 a 22,6% em amostras de surtos as quais apresentaram resultados negativos para NoV ou para NoV e bactérias enteropatogênicas (Ike et al., 2008; Pang et al., 2009, Lee et al., 2012). Co-infecções de SaV e outros vírus entéricos também são relatados em surtos de GA (Nakata et al., 2000; Bon et al., 2005; Lyman et al., 2009; Rasanen et al., 2010; Iritani et al., 2014).

Os SaV foram descritos associados a casos esporádicos no Japão, Holanda, Reino Unido, Dinamarca, Finlândia, EUA e Canadá com taxa de positividade variando entre 2,2 a 12,7% (Nakata et al., 1998; de Wit et al., 2001; Harada et al., 2009, Iturriza-Gomara et al., 2009; Dey et al., 2010; Chhabra et al., 2013; Pang et al., 2000; 2014). Nestes estudos, os SaVs variaram entre o segundo e o quarto principal agente patogênico dos casos de GA esporádica. Em ambientes fechados e com aglomeração, os SaV foram detectados em 7,0% nos EUA (Lyman et al., 2009), 19% na Dinamarca (Rosenfeldt et al., 2005) e 2,3% no Japão (Akihara et al., 2005).

Estes vírus também foram descritos em casos de GA em países em desenvolvimento da África subsaariana, como Quênia (5,7% em < 14 anos) (Mans et al., 2014), Tanzânia (5,7 – 6,4% em < 5 anos) (Liu et al., 2011; Elfving et al., 2014), Malawi (8% em <5 anos) (Dove et al., 2005), África do Sul (4,1 – 8,4% em todas as

idades) (Mans et al., 2010; 2014), Gabão (9,5% em <5 anos) (Lekana-Douki et al., 2015) e Burkina Faso (18% em <5 anos) (Matussek et al., 2015). Apesar da GA por SaV ser considerada branda, um estudo na África do Sul demonstrou estes vírus em crianças hospitalizadas e associados a mortes neste país. Os autores observaram que fatores determinantes que aumentaram as chances de ocorrência de SaV nessas crianças incluíam a superlotação, reduzido acesso a saneamento adequado e infecções concomitantes. Crianças com co-infecção com HIV e SaV apresentaram sangue nas fezes e baixo peso ao nascimento (Page et al., 2016).

Para os SaV há uma variabilidade temporal na predominância de alguns genótipos (Dey et al., 2012; Harada et al., 2012). No Japão estudos de epidemiologia molecular revelam que o GI.1 desempenha um importante papel em casos esporádicos de GA, seguido dos GI.6, GIV, GI.4, GI.8 e GII.1. Em 2004 – 2005, o GI.6 foi o genótipo mais comum detectado e associado com o primeiro surto de SaV em Osaka, sendo posteriormente substituído pelo ressurgimento de GI.1 em 2006 (Phan et al., 2006; 2007). Houve a emergência de GIV em 2007 (Harada et al., 2009), mas este genogrupo não foi detectado em 2008 – 2011; o GII.3 surgiu em 2008 e sua prevalência diminuiu gradualmente em 2009 e 2010; o GI.1 reapareceu predominantemente em 2010 (Harada et al., 2012). Dey e colaboradores (2012) observaram, entre os anos de 2003 a 2009, o genótipo GI.1 predominante em casos de GA, seguido dos GIV, GII.3, GII.2, GII.12 e GI.

1.8.3.1 *Norovirus e Sapovirus no Brasil*

No Brasil, o primeiro estudo de CaV humanos demonstrou, por microscopia eletrônica, a presença destes vírus em amostras de crianças sintomáticas e assintomáticas durante os anos de 1987 – 1988 no estado de São Paulo (Timenetsky et al., 1993). Posteriormente, Gabbay e colaboradores (1994) realizaram o primeiro estudo soropidemiológico para NoV em crianças e idosos de populações indígenas na Amazônia, com soroprevalência variando entre 39% e 100%. Parks e colaboradores (1999) determinaram pela primeira vez a diversidade genética dos NoV, com a detecção de GI e GII, em amostras de crianças menores de um ano hospitalizadas com gastroenterite grave, residentes em comunidades carentes da cidade de Fortaleza (Ceará).

Em seguida outros estudos, utilizando técnicas moleculares de detecção viral, demonstraram uma frequência variando de 7.8 a 35% de infecção por NoV em indivíduos de diversos grupos etários em diferentes regiões do país (Borges et al., 2006; Soares et al., 2007; Ferreira et al., 2010a; 2010b; de Andrade et al., 2014; Amaral et al., 2015). A grande diversidade genética dos NoV foi observada em diferentes cidades, sendo o GII o mais frequente, sobretudo o GII.4 (Gallimore et al., 2004; Castilho et al., 2006; Soares et al., 2007; Victoria et al., 2007; Andreasi et al., 2008; Nakagomi et al., 2008; Ribeiro et al., 2008; Xavier et al., 2009; Ferreira et al., 2008, 2010a; 2010b; 2012; Fioretti et al., 2011). Até o momento, nenhum dos estudos realizados no país demonstrou a presença do NoV GIV em amostras clínicas.

Dados de circulação dos SaV no Brasil são limitados, uma vez que estes vírus não estão incluídos na rotina de vigilância epidemiológica de agente causadores de GA. O conhecimento a respeito da presença destes vírus no país é proveniente de pesquisas realizadas principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Em estudo realizado em uma creche em Goiás foi demonstrado taxa de positividade para SaV em 4.6% das amostras analisadas, com detecção dos genótipos GI.1 e GI.3 em dois surtos (Marques Mendanha de Oliveira et al., 2014). Neste mesmo estudo, 28.6% (16/56) das crianças assintomáticas apresentaram resultado positivo para SaV, sendo demonstrado positividade maior estatisticamente significativa em crianças assintomáticas em relação às sintomáticas. No nordeste, estes vírus foram detectados em uma taxa de 9.8%, dos quais 22.6% eram de pacientes sintomáticos e 4.9% assintomáticos, dos casos estudados no estado do Maranhão entre os anos 1997 a 1999 (Portal et al., 2016). No Pará, estudos demonstraram esses vírus em 2.5% dos casos de GA em uma comunidade Quilombola, com circulação dos genótipos GI.1 e GII.2 (Aragão et al., 2013) e em 4.9% em crianças menores de 3 anos, onde foram caracterizados os genótipos GII.1 (66,7%), GI.1 (20%) e GI.2 (13,3%) (Aragão et al., 2010).

1.8.3.2 *Disseminação ambiental*

Estudos de virologia ambiental vêm evidenciando ampla disseminação no Brasil dos NoV GI e GII em diferentes ecossistemas aquáticos, com taxa de detecção variando em 4,5 – 14% em praias urbanas, 5,8 – 7.4% em rios, 18,8% em lagoas; 4,8% em mangues e 8 – 58% em águas de esgoto tratada e não-tratada, com

concentrações virais variando de 10^3 a 10^6 cópias genômicas/L (Miagostovich et al., 2008; Moresco et al., 2012; Victoria et al., 2010; 2014a; Fumian et al., 2013, Keller et al., 2013; Vieira et al., 2012; 2016). Em relação a disseminação no ambiente dos NoV GIV, estudos em águas de rio e esgoto demonstram taxa de positividade variando de 16,7% no Brasil (região Norte) (Teixeira et al., 2016), 21,8% em Itália (Muscillo et al., 2013), 50% no Japão (Kitajima et al., 2009; 2010b) e 67% nos EUA (Kitajima et al., 2014).

Apesar da grande diversidade de pesquisas realizadas para NoV em diferentes matrizes ambientais no Brasil, até o momento os SaV não foram descritos circulando no ambiente. Mundialmente, a disseminação de SaV no ambiente tem sido descrita no Japão (20 – 100%) (Kitajima et al., 2010a; 2011), Itália (12,5%), Espanha (Sano et al., 2011), África do Sul (14 – 92%) (Murray et al., 2013a), Quênia (31 – 34%) (Kiula et al., 2010) e EUA (Kitajima et al., 2014). Estudos demonstram carga viral de SaV em amostras de rio e esgoto variando 10^4 a 10^7 cópias/L (Haramoto et al., 2008; Kitajima et al., 2010a; 2014; Murray et al., 2015). A detecção de estirpes de SaV geneticamente indistinguíveis (isto é, com sequências parciais do genoma semelhantes ou idênticas) em amostras ambientais, tais como em moluscos bivalves, águas superficiais ou em esgotos, daquelas detectadas em amostras clínicas sugerem a origem fecal humana destes vírus, a qual foi lançada em águas ambientais e acumulados em organismos filtradores (Hansman et al., 2007a; 2007b; Iwai et al., 2009; Kitajima et al., 2010a; 2011; Sano et al., 2011; Di Bartolo et al., 2013; Iizuka et al., 2010; 2013; Murray et al., 2013a; 2013b). Os SaVs são detectados com maior frequência em amostras de água (esgoto e rio) nas estações mais frias do ano, em países de clima temperado, (Haramoto et al., 2008; Kitajima et al., 2010a; Sano et al., 2011) quando o número de pacientes com GA esporádica associada a SaV aumenta (Johnsen et al., 2009; Tam et al., 2012; Dey et al., 2012; Harada et al., 2012; 2013).

1.9 Diagnóstico

A primeira geração de métodos de diagnóstico dos CaV foi estabelecida nas décadas de 1970 e 1980, através da técnica de imunomicroscopia eletrônica utilizando reagentes provenientes de indivíduos previamente infectados por estes vírus. As fezes de pacientes infectados em fase aguda serviam como fonte de antígenos virais, assim

como o soro de fase convalescente era utilizado como soro hiperimune (Atmar e Estes, 2001).

A técnica de microscopia eletrônica para detecção direta de vírus em espécimes fecais requer uma concentração viral de pelo menos 10^6 partículas por mg de fezes, tornando a técnica pouco sensível quando as amostras clínicas possuem baixa carga viral (Doane, 1994).

Em 1990, o sequenciamento completo do genoma dos NoV propiciou o desenho de iniciadores específicos que flanqueiam a região do gene que codifica para a polimerase, que por ser uma região conservada, é capaz de detectar diferentes estirpes (Jiang et al., 1990). Desde então, outros calicivírus humanos tiveram seu genoma completo sequenciado (Jiang et al., 1993; Lambden et al., 1993; Dingle et al., 1995).

Jiang e colaboradores (1992b) estabeleceram um sistema de expressão da proteína do capsídeo viral (VP1) em baculovirus, permitindo a obtenção de antígeno viral e de soro hiperimune em animais, possibilitando o desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos (EIE). Atualmente, esta metodologia tem sido utilizada em testes de triagem de surtos para NoV, com sensibilidade variando em 55 – 83 % e especificidade de 92 – 98% (Lopman et al., 2002; Richards et al 2003; Morillo et al., 2011a; Siqueira et al., 2011). EIEs têm sido desenvolvidos para a detecção de antígenos de SaV em amostras clínicas (Nakata et al., 1988; 1998; Hansman et al., 2006), entretanto esses testes não são amplamente utilizados devido à dificuldade na detecção de estirpes de SaV antigenicamente diferentes, à baixa sensibilidade quando comparada com métodos moleculares e à atual falta de disponibilidade comercial (Oka et al., 2015).

A partir da década de 1990, com o avanço de técnicas de biologia molecular, foram estabelecidos os primeiros protocolos de detecção viral pela técnica de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) para os NoV e SaV (De Leon et al., 1992; Jiang et al., 1992a; 1999; Ando et al., 1995; Green et al., 1995; Honma et al., 2000). Desde então, protocolos qualitativos e quantitativos têm sido utilizados como método de detecção e quantificação dos NoV e SaV. As principais regiões utilizadas para esta finalidade são a da polimerase e da junção polimerase e VP1, as quais são as mais conservadas do genoma (Beuret et al., 2002; Kageyama et al., 2003; Oka et al., 2006; Trujillo et al., 2006).

O padrão ouro para genotipagem e estudos de filogenia dos NoV e SaV é o sequenciamento completo da VP1. Entretanto esta técnica é laboriosa, uma vez que este gene possui aproximadamente 1600 pares de base. Desta maneira, o sequenciamento parcial de diferentes regiões da polimerase e do capsídeo, tem sido utilizado (Beuret et al., 2002; Kojima et al., 2002; Vinjé et al., 2004; Kitajima et al., 2010a), embora as regiões da polimerase não ofereçam padrão discriminatório eficiente, sendo as regiões do capsídeo largamente utilizadas para estudos de epidemiologia molecular (Victoria et al., 2007; Ferreira et al., 2008; 2012; Barreira et al., 2010; Fioretti et al., 2011; Silva et al., 2013; Vicentini et al., 2013; de Andrade et al., 2014). As principais regiões do genoma dos NoV utilizadas para o sequenciamento parcial da VP1 são denominadas C e E (extremidade 5' da ORF2) e região D (extremidade 3' da ORF2) sendo utilizadas para a caracterização dos genogrupos e genótipos de NoV (Noel et al., 1997; Kojima et al., 2002; Vinjé et al., 2004).

Para caracterização das variantes de NoV GII.4, Vega e colaboradores (2011) desenvolveram um protocolo com iniciadores específicos que amplificam a região codificante do subdomínio P2 do capsídeo viral (674 pb), que por acumular maior número de mutações, tem sido útil nesta caracterização, substituindo o sequenciamento completo da ORF2.

Em virtude à implementação de classificação binária para NoV, a análise de mais de uma região do genoma (polimerase e VP1) também é importante para a detecção de estirpes únicas ou recombinantes (Vinjé et al., 2000). Neste contexto, têm sido utilizados protocolos que amplificam a região 3' da ORF1 (polimerase) e a região 5' da ORF2 (capsídeo), possibilitando a caracterização simultânea de ambas as ORFs (Fumian et al., 2012).

Devido à ampla distribuição geográfica e variabilidade genética dos NoV, foi estabelecido uma rede global de vigilância eletrônica, a Noronet, seguindo um acordo entre três redes envolvidas na vigilância molecular destes vírus: a rede de vigilância da Austrália e Nova Zelândia, a rede de transmissão de vírus por alimentos da Europa e a Calicinet nos EUA. O objetivo desta rede global de vigilância é a ampliação dos conhecimentos a respeito das tendências geográficas e temporais no surgimento e disseminação de variantes de NoV e também a criação de uma nomenclatura padronizada e fundamentada para genótipos e variantes de GII.4. Este sistema de vigilância eletrônica inclui dados moleculares e epidemiológicos de NoV de diferentes países, bem como uma ferramenta de genotipagem automática em que sequências

de qualquer região do genoma NoV podem ser inseridos e classificados utilizando métodos filogenéticos. Esta abordagem permite a identificação da emergência de novas estirpes epidêmicas, demonstrando a importância dos NoV como agentes de surtos e casos esporádicos de gastroenterite aguda em todo o mundo (Kroneman et al., 2011).

1.10 Prevenção, controle e vacina

A prevenção de surtos de GA causados pela infecção por NoV depende da identificação do modo de transmissão. De modo geral a interrupção da transmissão é obtida pela implementação de medidas de controle da contaminação de alimentos e da água, mantendo ao mesmo tempo uma higiene adequada nos manipuladores de alimentos e reduzindo a propagação do surto pelo contato pessoa-pessoa. Atualmente, existem metodologias que permitem a detecção dos NoVs diretamente de águas ou alimentos contaminados, auxiliando na identificação e eliminação da fonte de contaminação prevenindo novas infecções (Katayama et al. 2002; Calgua et al., 2013; Fumian et al. 2009; Melgaço et al., 2016).

É recomendado o afastamento de manipuladores de alimentos infectados por no mínimo 3 dias após a resolução dos sintomas e, para evitar a transmissão pessoa-pessoa, adultos e crianças infectados devem se manter afastados das atividades escolares e de trabalho pelo mesmo período de tempo (CDC, 2011) Medidas como higienização das mãos com água e sabão, principalmente após usar o banheiro e trocar fraldas de bebês, antes de fazer refeições ou de manipular alimentos podem diminuir os riscos de infecção por NoV. Desinfetantes à base de álcool podem ser utilizados, mas não como substitutos da lavagem das mãos. Alimentos como frutas e verduras devem ser lavados e moluscos filtradores devem ser cozidos completamente. Superfícies de preparo de alimento devem ser desinfetadas, utensílios de cozinha, toalhas e uniformes devem ser lavados. Após episódios de vômito e diarreia, superfícies contaminadas devem ser desinfetadas com solução de hipoclorito a 5-25% ou 1000 a 5000 ppm (CDC, 2011). Após um surto ou epidemia com duração prolongada, interromper o funcionamento de estabelecimentos como

navios de cruzeiro, resorts, acampamentos e restaurantes é essencial para evitar a exposição de uma nova população de suscetíveis (Patel et al., 2009).

Desde que proteínas do capsídeo viral de NoV foram expressas como partículas semelhantes a vírus (VLPs) (Jiang et al., 1992b), estas têm sido consideradas como principais candidatos a vacina de NoV. As VLPs são morfológica e antigenicamente indistinguíveis dos NoV, e por não possuírem material genético em seu interior, estas partículas não apresentam capacidade replicativa. Os primeiros estudos com VLPs demonstram que estas que podem induzir resposta imunológica humoral e de mucosa em camundongos e seres humanos quando administradas por via oral, intranasal ou parentérica (Ball et al., 1998; 1999; Guerrero et al., 2001; Tacket et al., 2003; Herbst-Kralovetz et al., 2010). As principais dificuldades na elaboração de uma vacina para NoV incluem a eventual necessidade de reformulação no caso de surgimento de novas variantes antigênicas, como acontece com as vacinas da gripe. Devido à biologia dos vírus e a resposta imune nos humanos, há uma série de características que determinarão o sucesso e relevância para a saúde pública de uma vacina NoV. Os principais pontos a serem solucionados são se a vacina desenvolvida irá proporcionar uma proteção ampla contra vários genótipos; como uma infecção prévia por NoV afetará a imunogenicidade e a eficácia da vacina; se a mesma formulação e cronograma será eficaz em todos os grupos etários e como a suscetibilidade genética poderá afetar o êxito desta (CDC, 2015).

2 RELEVÂNCIA

Ao longo dos últimos 20 anos os NoV têm se destacado como importantes agentes de surtos de GA não bacterianos, com crescente impacto em pandemias principalmente devido à capacidade evolutiva do genótipo GII.4. Este genótipo, apresenta um padrão de sazonalidade distinto quando comparado com outros genótipos, sendo a sua prevalência atribuída a emergência e substituição de variantes em intervalos de dois a quatro anos. No Brasil, estudos anteriores demonstraram sua circulação em diversos estados da federação, assim como sua associação a surtos e casos esporádicos, embora poucos tenham caracterizado as variantes circulantes, assim como a evolução das mesmas no país (Ferreira et al., 2008; 2012; Fioretti et al., 2011; Aragão et al., 2013; Silva et al., 2013; de Andrade et al., 2014). Outra lacuna se refere à falta de informações sobre a circulação dos CaV humanos considerados emergentes. Grande parte dos estudos estão restritos a investigação dos NoV GI e GII, com poucos trabalhos incluindo a pesquisa de NoV GIV ou SaV, mesmo com a crescente importância destes agentes associados a casos de GA.

Atualmente, a detecção de vírus em águas residuárias complementam dados epidemiológicos de vigilância em saúde, uma vez que refletem o fluxo dos vírus da população que é atendida por uma determinada rede de esgotamento sanitário, contribuindo principalmente com a detecção e caracterização molecular de vírus associados a infecções assintomáticas ou brandas ou que ainda não tenham seu impacto estabelecido em uma dada população.

Neste contexto, esta tese teve como objetivo principal expandir os conhecimentos a respeito da diversidade dos CaV humanos no país, contribuindo com um estudo de dinâmica temporal das variantes de NoV GII.4 circulantes em um intervalo de nove anos, assim como com estudo de vigilância laboratorial para investigação dos NoV GIV e SaV em amostras clínicas e ambientais, a fim de se avaliar a frequência, a carga viral e a diversidade genética destes vírus no estado do Rio de Janeiro.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Demonstrar a diversidade genética dos CaV humanos pela caracterização molecular das variantes do genótipo GII.4 no Brasil (2004 – 2012), e pela detecção de novos agentes como os NoV GIV e SaV no Rio de Janeiro durante o período de 20012 a 2014.

3.2 Específicos

- 1) Identificar as variantes de NoV GII.4 e caracterizar o padrão de temporalidade da circulação das mesmas no país durante os anos de 2004 – 2012.
- 2) Determinar a frequência e a diversidade genética dos NoV e SaV humanos em casos de gastroenterite aguda ocorridos no Estado do Rio de Janeiro no período de 2012 – 2014.
- 3) Avaliar a disseminação destes vírus em amostras de esgoto tratado e não tratado coletadas entre os anos de 2013 – 2014 na estação de tratamento de esgoto (ETE – Alegria) do Rio de Janeiro.

4 METODOLOGIAS E RESULTADOS

As seções “Metodologias” e “Resultados” deste trabalho de tese estão apresentados sob forma de manuscritos publicados ou em processo de submissão (itens 4.1, 4.2 e 4.3).

O manuscrito 4.1 apresenta os resultados relacionados a caracterização das variantes de NoV GII.4 (objetivo específico 1), enquanto que os manuscritos dos itens 4.2 e 4.3 apresentam os resultados referentes aos dados de frequência, diversidade genética e disseminação ambiental do NoV GIV e SaV, respectivamente.

Temporal Dynamics of Norovirus GII.4 Variants in Brazil between 2004 and 2012

Julia Monassa Fioretti^{1*}, Gonzalo Bello², Mônica Simões Rocha¹, Matias Victoria³, José Paulo Gagliardi Leite¹, Marize Pereira Miagostovich¹

1 Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratório de AIDS & Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Universidad de La República, Laboratorio de Virologia Molecular – Regional Norte, Ciudad de Salto, Uruguay

Abstract

Noroviruses (NoVs) are the major cause of acute gastroenteritis outbreaks, and, despite a wide genetic diversity, genotype II.4 is the most prevalent strain worldwide. Mutations and homologous recombination have been proposed as mechanisms driving the epochal evolution of the GII.4, with the emergence of new variants in 1–3-year intervals causing global epidemics. There are no data reporting the dynamics of GII.4 variants along a specific period in Brazil. Therefore, to improve the understanding of the comportment of these variants in the country, the aim of this study was to evaluate the circulation of NoV GII.4 variants during a 9-year period in 3 out of 5 Brazilian regions. A total of 147 samples were sequenced, and a phylogenetic analysis of subdomain P2 demonstrated the circulation of six GII.4 variants, Asia_2003, Hunter_2004, Den Haag_2006b, Yerseke_2006a, New Orleans_2009, and Sydney_2012, during this period. The most prevalent variant was Den Haag_2006b, circulating in different Brazilian regions from 2006 to 2011. A Bayesian coalescent analysis was used to calculate the mean evolutionary rate of subdomain P2 as 7.3×10^{-3} (5.85×10^{-3} – 8.82×10^{-3}) subst./site/year. These analyses also demonstrated that clade Den Haag_2006b experienced a rapid expansion in 2005 and another in 2008 after a period of decay. The evaluation of the temporal dynamics of NoV GII.4 in Brazil revealed a similar pattern, with few exceptions, to the worldwide observation. These data highlight the importance of surveillance for monitoring the emergence of new strains of NoV GII.4 and its impact on cases of acute gastroenteritis.

Citation: Fioretti JM, Bello G, Rocha MS, Victoria M, Leite JPG, et al. (2014) Temporal Dynamics of Norovirus GII.4 Variants in Brazil between 2004 and 2012. PLoS ONE 9(3): e92988. doi:10.1371/journal.pone.0092988

Editor: Pierre Roques, CEA, France

Received: December 17, 2013; **Accepted:** February 27, 2014; **Published:** March 25, 2014

Copyright: © 2014 Fioretti et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by Excellence Program of Research (PROEP-CNPq/IOC) and General Coordination of Laboratories/Secretary of Health Surveillance, Ministry of Health. MP Miagostovich, JPG Leite and G Bello are CNPq fellows. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: juliafioretti@ioc.fiocruz.br

Introduction

Noroviruses (NoVs) are considered to be the major causative agent of acute gastroenteritis (AGE) outbreaks worldwide [1]. In developing countries, it is estimated that it causes annually 1.1 million hospitalizations and 200,000 deaths in children under 5 years of age [2].

The genus *Norovirus* belongs to the Caliciviridae family, which comprises nonenveloped viruses with an icosahedral symmetry of approximately 27–30 nm in diameter. The NoV genome is composed of a positive-sense single-stranded RNA covalently linked to VPg at the 5' end and polyadenylated at the 3' end, 7.5–7.7 kb in length. The genome is organized into three open reading frames (ORF), with ORF1 encoding six non-structural proteins, including the RNA-dependent RNA-polymerase, ORF2 encoding the structural protein VP1 that composes the viral capsid, and ORF3 encoding the structural protein VP2 [3]. VP1 is divided into a highly conserved shell (S) domain and a variable protruding (P) domain, which is further subdivided into subdomains P1 and P2. The protruding P2 domain, located at the most exposed surface of the viral capsid, is the major responsible for the antigenicity of the virus and determines interaction with host cell attachment factors (histo-blood group antigen, HBGA) [4,5]. NoV has been classified into five genogroups on the basis of the VP1

sequence (GI to GV) that can be further subdivided into more than 36 genotypes [6]. Recently, a standardization of NoV nomenclature was proposed based on the classification of the VP1 and ORF1 sequences due to the common event of recombination in the hotspot ORF1/ORF2 [7].

Despite the wide genetic diversity of NoV, GII.4 has been described as the most prevalent NoV genotype and has been associated with AGE outbreaks and sporadic cases worldwide since the mid-1990s [8,9,10,11]. Two mechanisms have been proposed to allow the persistence of NoV GII.4 in the population: receptor switching and antigenic variation, which facilitate an expansion of the host range and the escape of new strains from herd immunity [12]. Many studies have shown that the rapid rate of evolution and fixation of amino acid changes in the capsid P2 subdomain might result in altered antigenicity, allowing escape from the host immune responses directed toward the previous circulating variant [10,13,14,15]. This continuous diversification allows the emergence of new epidemic NoV GII.4 lineages in incremental periods, a temporal dynamic comparable to that of influenza A virus [16].

The first GII.4 variant associated with epidemic outbreaks was 95/96US detected in Australia, Europe, and the USA [17,18]. Since this time, six pandemic variants named Farmington

Hills_2002, Hunter_2004, Yerseke_2006a, Den Haag_2006b, New Orleans_2009, and Sydney_2012 have been described as emerging in intervals of 1–3 years [9,14,15,19–27]. Other GII.4 variants have been described, including Henry_2001, Japan_2001, Asia_2003, Osaka_2007, and Apeldoorn_2008; however, these viruses exhibited no pandemic characteristics [22,28–31]. Hence, the constant surveillance of new emerging variants of NoV GII.4 is fundamental due to its large impact on public health [32].

Brazilian studies regarding NoV epidemiology refer to the characterization of samples from a single state or geographic region, whereas there is an absence of large-scale analyses that meet the continental dimensions of the country [11,33–41]. Recently, our group demonstrated the genetic diversity of NoV genotypes circulating in different Brazilian regions [42]. However, the specific GII.4 variants circulating in Brazil remain unknown. Thus, the present study aims to expand the data regarding the temporal dynamics and genetic characteristics of NoV GII.4 variants circulating in the country between 2004 and 2012.

Materials and Methods

Sample Collection

Stool samples were obtained by spontaneous demand of inpatients and outpatients from AGE outbreaks or sporadic cases attending in public health centers including hospitals and central laboratories of the country. Samples were shipped to the laboratory under refrigeration for the diagnosis of viral gastroenteritis. Between 2004 and 2012 the laboratory tested 8900 stool samples for NoV diagnosis, confirming 30.1% of those. The percentage of annual detection ranged from 19.5% to 32.7%, except in 2006 when this percentage reached 47.4% (659/1389). NoV were detected using the region B (RNA-dependent RNA-polymerase) RT-PCR protocol previously described [43] and genotyped as NoV GII.4 by the partial nucleotide sequencing of region D (VP1) [44]. A total of 147 NoV GII.4 samples previously characterized were selected from 12 states of the three most highly populated regions of Brazil (Northeast, South, and Southeast), representing approximately 85% of the country's population (190,732,694 inhabitants - Brazilian Institute of Geography and Statistics - IBGE 2010).

Ethics Statement

This study was approved by the Ethics Committee of Oswaldo Cruz Foundation (CEP 311/06) and is part of an official Brazilian Ministry of Health's surveillance. In this ongoing program the diagnosis of gastroenteritis is required to elucidate the viral etiology and data are maintained anonymous.

Molecular Characterization

A 10% stool suspension was prepared in 0.01 M Tris-HCl and 0.0015 M Ca^{2+} (pH 7.2). The RNA extraction was performed using a QIAmp viral RNA Mini kit (Qiagen, Valencia, Calif., USA) according to the manufacturer's instructions, and the synthesis of complementary DNA (cDNA) was performed using a random primer, pd(N)6 (Amersham Biosciences, UK). The amplification was performed using a set of primers that target the partial region of the genome that encodes the main VP1 capsid protein (subdomain P2), a fragment situated in ORF2 [23]. The amplicons obtained were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's recommendations and quantified using a spectrophotometer (Qubit, USA). DNA sequencing was performed using the dideoxynucleotide chain termination method with the ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

1, v. 3.1 and the ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (both from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) by the genomic platform of DNA sequencing PdTIS/FIOCRUZ.

Phylogenetic Analyses

The Brazilian sequences obtained in this study were aligned with reference strains of each NoV GII.4 variant and three sequences from Taiwan (HQ456344), Sweden (JN183166), and Japan (AB541348) using the tool CLUSTALW in the MEGA5.2 program [45,46]. A Maximum Likelihood (ML) tree was reconstructed with program PhyML [47] using an online web server [48]. A heuristic tree search was performed using the SPR branch-swapping algorithm, and the reliability of the obtained topology was estimated with the approximate likelihood-ratio test (*aLRT*) [49] based on a Shimodaira-Hasegawa-like procedure. The trees were visualized using the FigTree v1.3.1 program [50].

Evolutionary and Demographic Analyses

The rate of nucleotide substitution per site per year (subs./site/year), the time to the most recent common ancestor (T_{MRC}), and the demographic history of NoV GII.4 were jointly estimated using the Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) approach implemented in the BEAST v1.7.5 package [51]. The temporal scale of the evolutionary process was directly estimated from the sampling dates of the sequences using the GTR+H+ Γ_4 nucleotide substitution model, selected using the jModeltest program [52], a relaxed uncorrelated lognormal molecular clock model [53], and a Bayesian Skyline coalescent tree prior [54]. The MCMC analysis was performed for 50 million generations, and the convergence of parameters was assessed by calculating the Effective Sample Size (ESS) using the TRACER v1.5 program after excluding the initial 10% of the run. Uncertainty in the parameter estimates was reflected in 95% HPD intervals. The programs TreeAnnotator v1.7.5 and FigTree v1.4.0 were used to summarize the posterior tree distribution and to visualize the annotated Maximum Clade Credibility (MCC) tree, respectively.

GenBank Accession Numbers

The nucleotide sequences obtained in this study were submitted to the National Center for Biotechnology Information (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and received the following accession numbers: JX975499–JX975614 and KF434555–KF434585.

Results

Identification of NoV GII.4 Variants Circulating in Brazil

An ML phylogenetic analysis of the subdomain P2 of gene encoding VP1 from 147 NoV GII.4 Brazilian samples demonstrated the presence of six variants in different states of the country during the 2004–2012 period (Fig. 1). The samples classified as Den Haag_2006b were grouped into two remarkably separate subclusters, here denominated as “O” (oldest), which comprises 40 samples collected during 2006–2008, and “Y” (youngest), which comprises 24 samples from the period 2009–2011 (Fig. 1).

For most of the years analyzed, it was possible to detect at least two different variants co-circulating in Brazil (Table 1 and Fig. 2), and a clear variation in the frequency of the different variants over time was also observed. The most prevalent variants were Asia_2003 in 2004, Hunter_2004 in 2005, Den Haag_2006b in 2006–2010, Yerseke_2006a in 2008–2009, New Orleans_2009 in 2010–2011, and Sydney_2012 in 2012 (Table 1 and Fig. 2). In addition, the variants Den Haag_2006b, Yerseke_2006a, New Orleans_2009, and Sydney_2012 were detected in all three Brazilian regions evaluated.

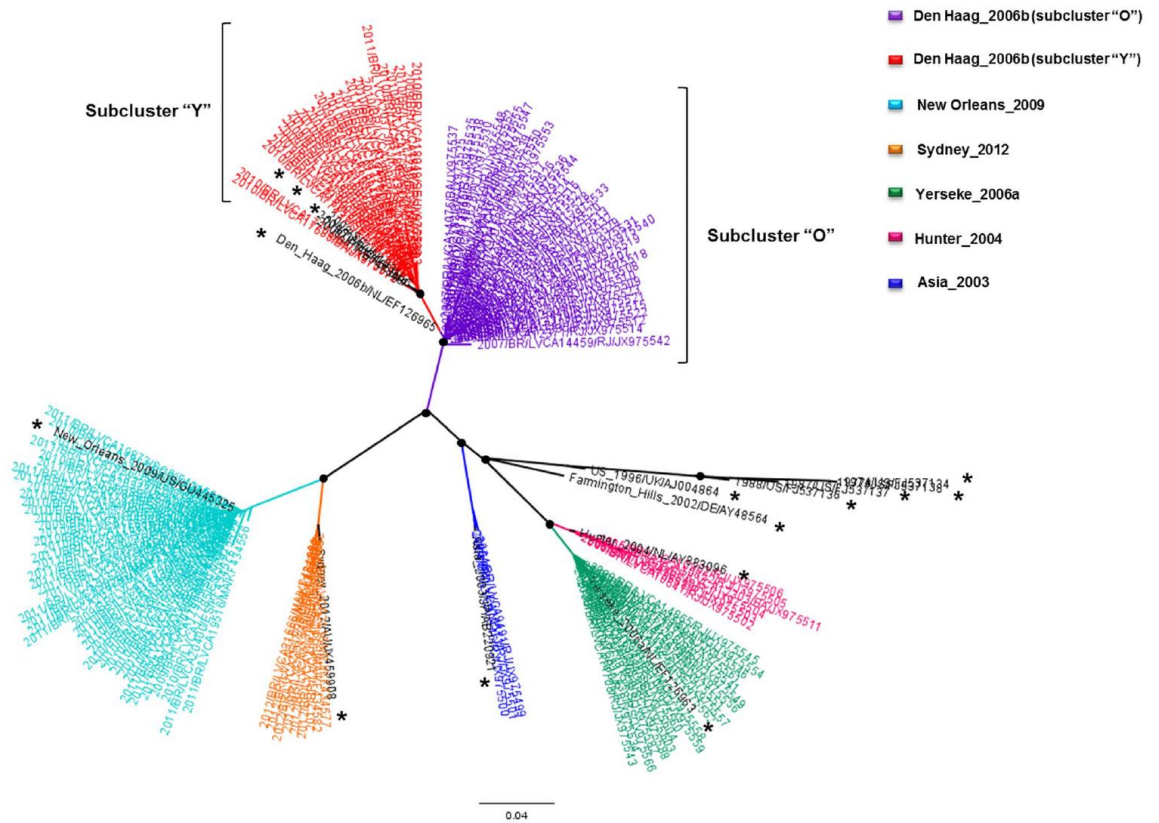


Figure 1. ML tree of P2 subdomain sequences (630 pb) from Brazilian (n = 147) and non-Brazilian strains (n = 15). The black circles represent nodes with aRT ≥ 0.9. The non-Brazilian samples are marked in black and with an asterisk. Horizontal branch lengths are drawn to scale with the bar at the bottom indicating nucleotide substitutions per site. doi:10.1371/journal.pone.0092988.g001

Evolutionary History of NoV GII.4 Variants

To reconstruct the time-scale of the NoV GII.4 epidemics, we performed a Bayesian coalescent analysis of partial VP1 sequences

of Brazilian origin and reference samples isolated between 1974 and 2012. The mean evolutionary rate of the subdomain P2 was calculated as 7.3×10^{-3} (5.85×10^{-3} – 8.82×10^{-3}) subst./site/year.

Table 1. NoV GII.4 variants detected in Brazil during the period 2004–2012.

Year	Brazilian region	GII.4 variant
2004	Southeast	Asia_2003 (n = 2)
2005	Southeast	Asia_2003 (n = 1); Hunter_2004 (n = 5)
2006	Northeast, South, Southeast	Hunter_2004 (n = 1); Den Haag_2006b (n = 21)
2007	Northeast, South, Southeast	Yerseke_2006a (n = 2); Den Haag_2006b (n = 12)
2008	Northeast, South, Southeast	Yerseke_2006a (n = 6); Den Haag_2006b (n = 7)
2009	Northeast, South, Southeast	Yerseke_2006a (n = 8); Den Haag_2006b (n = 7); New Orleans_2009 (n = 3)
2010	Northeast, South, Southeast	Yerseke_2006a (n = 4); Den Haag_2006b (n = 15); New Orleans_2009 (n = 22)
2011	Northeast, South, Southeast	Den Haag_2006b (n = 2); New Orleans_2009 (n = 20)
2012	Northeast, South, Southeast	Sydney_2012 (n = 9)

The number in parentheses denotes the quantity of samples sequenced. doi:10.1371/journal.pone.0092988.t001

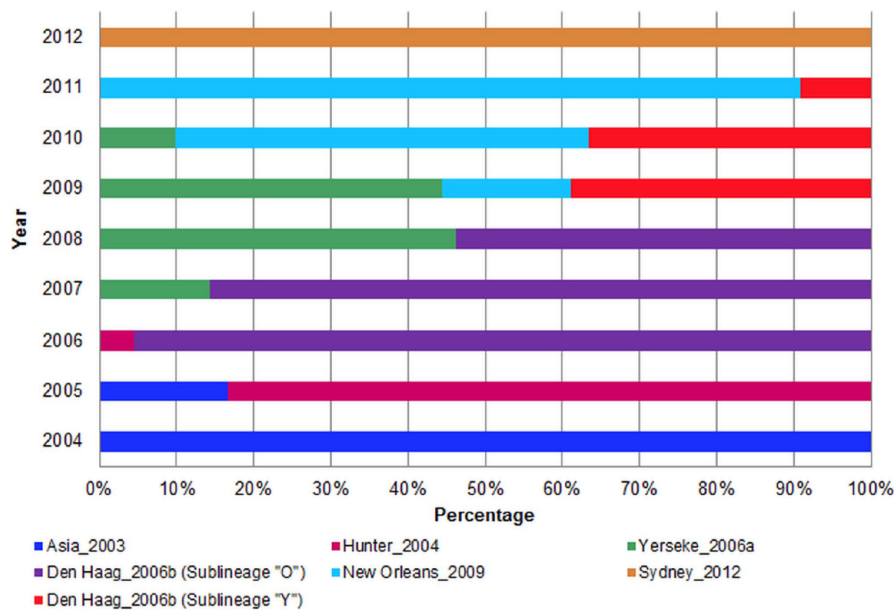


Figure 2. Temporal dynamics of the prevalence of NoV GII.4 variants in Brazil during the 2004–2012 period.
doi:10.1371/journal.pone.0092988.g002

Considering this substitution rate, the mean T_{MRCA} of the NoV GII.4 variants were estimated as follows: 2002 (95% HPD: 2001–2003) for Asia_2003; 2003 (95% HPD: 2003–2004) for Hunter_2004; 2005 (95% HPD: 2005–2006) for Yerseke_2006a; 2005 (95% HPD: 2004–2006) for Den Haag_2006b; 2008 (95% HPD: 2008–2009) for New Orleans_2009; and 2011 (95% HPD: 2011–2012) for Sydney_2012 (Fig. 3). Within the Den Haag_2006b variant, the T_{MRCA} of subclusters “O” and “Y” was dated to 2005 (95% HPD: 2005–2006) and 2008 (95% HPD: 2007–2008), respectively.

Demographic History of the NoV GII.4 Den Haag_2006b Variant

Estimations of the demographic history of the NoV GII.4 Den Haag_2006b lineage was next performed using the Bayesian skyline plot method (Fig. 4). This analysis demonstrated that clade Den Haag_2006b experienced a rapid expansion in 2005 after which the population reached a maximum effective population size in early 2006 and then began to decay. It is possible to observe a new and sharp expansion of the effective population size circa mid-2008, which coincides with the T_{MRCA} of subcluster “Y”, and a later stabilization during 2009 and 2010.

Discussion

NoV GII.4 is the most prevalent genotype of NoV is associated with worldwide acute gastroenteritis outbreaks [10,11,14,42,55]. A phylogenetic analysis of subdomain P2 of the VP1 gene allowed the identification of six different variants of NoV GII.4 that were sequentially detected in Brazil during the 2004–2012 periods. In most of the years analyzed, two or three different GII.4 variants were detected simultaneously in Brazil, a pattern comparable to that observed in Japan during the years 2005–2009 [22].

The first variant detected in Brazil in 2004 was Asia_2003, which was described as a recombinant strain, with an ORF1

sequence belonging to GII.12 (Wortley-like) and ORF2 and –3 sequences belonging to GII.4. However, this variant does not feature pandemic characteristics and was demonstrated as only causing outbreaks in Asia, Oceania, and the United Kingdom between 2002 and 2006 [14,30,56,57]. The lineage Hunter_2004 was the next to become dominant in Brazil in 2005 and was associated with global gastroenteritis outbreaks between 2004 and 2005 [58]. The first description of this variant in Latin America was in Paraguayan children also during the years 2004 and 2005 [58].

Two different variants most likely emerged in 2005 and were detected globally in 2006: the Yerseke_2006a and Den Haag_2006b variants that share a common ancestor with Hunter_2004 and Fargminton Hills_2002, respectively. Both variants were detected in all Brazilian regions analyzed, but they spread and died out with very different dynamics. The Den Haag_2006b variant replaced Hunter_2004 in Brazil in 2006 and was the most prevalent lineage during the period of 2006–2008. The Yerseke_2006a variant was first detected in Brazil in 2007 and did not replace the previous variant Den Haag_2006b, though both variants co-circulated at equal proportions during 2008–2009. The detection rate of Yerseke_2006a decreased by 2010, whereas Den Haag_2006b remained detectable until 2011. Another different temporal dynamic was observed in Europe and Oceania, where Yerseke_2006a was the dominant clade in the 2005/2006 season and was replaced by Den Haag_2006b in summer/fall of 2007 [60,61,62].

The variant New Orleans_2009 was first detected to be circulating in Brazil in December 2009. By 2010, this variant reached a frequency that was similar to variants Yerseke_2006a and Den Haag_2006b together, becoming the dominant clade by 2011. In the USA, this variant was first detected during the winter of 2009/2010, causing 60% of all outbreaks associated with NoV and replacing the Den Haag_2006b variant as the predominant GII.4 lineage [23,24].

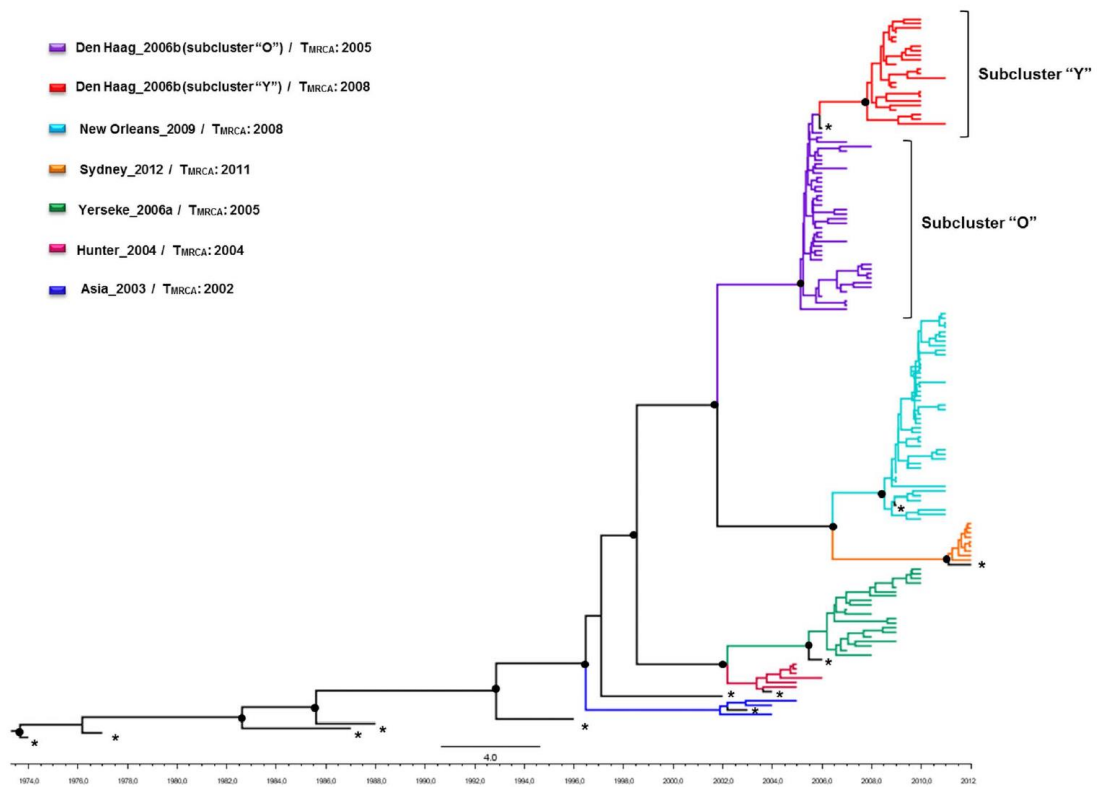


Figure 3. MCC tree of NoV GII.4 subdomain P2 sequences (630 pb) from Brazilian (n=147) and non-Brazilian strains (n=12). The black circles represent nodes with posterior ≥ 0.9 . The non-Brazilian samples are marked in black and with an asterisk. doi:10.1371/journal.pone.0092988.g003

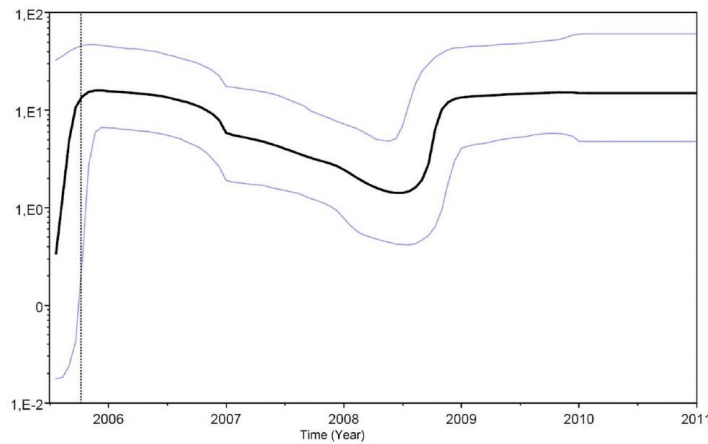


Figure 4. Bayesian skyline plot of variant Den Haag_2006b. The black line represents the median posterior value, and the blue lines indicate the 95% Highest Probability Density (HPD) intervals. The Y-axis depicts the value of Net on a logarithmic scale. doi:10.1371/journal.pone.0092988.g004

The variant Sydney_2012 was first detected in 2012 in all of the Brazilian regions evaluated - Northeast, Southeast, and South - replacing New Orleans_2009. A recent report demonstrated this variant as circulating in Northern Brazil, causing sporadic cases in hospitalized children [41]. This strain also became the predominant NoV variant in the USA in 2012/2013, but its emergence was not associated with an increase in the activity of outbreaks when compared to previous seasons [63].

The mean estimated rate of evolution (7.3×10^{-3} subst./site/year) of subdomain P2 of VP1 in our study was similar to the rates reported in previous studies for the entire VP1 gene (1.9 to 9.0×10^{-3} subst./site/year) [15,64,65,66]. The mean T_{MRC} of the six variants detected in Brazil [Asia_2003 (2002), Hunter_2004 (2003), Yerseke_2006a (2005), Den Haag_2006b (2005), New Orleans_2009 (2008), and Sydney_2012 (2011)] demonstrates that the diversification process starts at least one year before the variant becomes a dominant strain and causing epidemics worldwide. Many studies have proposed that a strain circulates at low levels, accumulating mutations for some time before became pandemic [62].

The reconstruction of the demographic history of the Den Haag_2006b clade demonstrates that, after a rapid increase in 2005, the population reached a maximum effective size early in 2006 (when this variant was first detected) and then decayed until mid-2008. Since mid-2008, the Den Haag_2006b lineage sharply increased again, reaching a new maximum effective population size in 2009. A recent Argentinian study evaluated the temporal dynamics of this variant and found that the effective population size increased in mid-2004 and started to decrease in 2008 [67]. Such complex demographic patterns of this variant might be related to the existence of two distinct sublineages of Den Haag_2006b: the “Y” sublineage that emerged circa 2008 is a descendant from the “O” sublineage; from most likely emerged circa 2005. The estimated emergence of the subcluster “Y” coincides with the second expansion phase of the Den Haag_2006b variant. The identification of a few samples from Taiwan, Sweden, and Japan that grouped with subcluster “Y” suggests that this sublineage is not exclusive to Brazil. It is interesting to note that subcluster “Y” displayed a large number of

substitutions at residues 255, 357, 368 and 425 in relation to subcluster “O” (data not shown). The residue 368 is located in putative epitope “A” of the viral capsid that is most likely responsible for the difference in antigenicity among NoV GII.4 variants [68,69], thus suggesting that subclusters “O” and “Y” of the Den Haag_2006b lineage may represent distinct antigenic variants of NoV GII.4.

As suggested by de Rougemont et al. (2011) [70], the greater prevalence of variant Den Haag_2006b could correlate with the binding capability to secretor and nonsecretor populations when compared with Yerseke_2006a strains. In Brazil, there is only one study that characterizes the genetic diversity of the HBGAs types from a small population of descendants of slaves living in semi-isolated rural areas [71]. Further studies including structure modeling of these variants and characterization of HBGAs polymorphisms of Brazilian population to relate the binding properties of NoV should be conducted for clear understanding of predominance of variants GII.4 in the country.

In developed countries, the emergence and replacement of NoV GII.4 variants over the years have pointed to the establishment of NoV surveillance networks as an approach to a better understanding of the epidemiology of this virus and to guide preventive measures against outbreaks [23,32]. In the present study, the temporal dynamics of NoV GII.4, with few exceptions, were similar worldwide, stressing the need for further studies on the continuous epidemiological surveillance of the circulation of NoV genotypes and GII.4 variants in Brazil.

Acknowledgments

The authors thank the staff of the Central Laboratories of the States (LACEN) for sending the clinical specimens.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JMF MSR MPM. Performed the experiments: JMF MSR. Analyzed the data: JMF GB MV JPGL MPM. Contributed reagents/materials/analysis tools: JPGL MPM. Wrote the paper: JMF GB JPGL MPM.

References

- Glass RI, Parashar UD, Estes MK (2009) Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 361(18): 1776–85.
- Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD (2009) Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol* 44(1): 1–8.
- Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, et al. (1999) X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286: 287–90.
- Chen R, Neill JD, Estes MK, Prasad BV (2006) X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(21): 8048–53.
- Cao S, Lou Z, Tan M, Chen Y, Liu Y, et al. (2007) Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 81(11): 5949–57.
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, et al. (2006) Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 15; 346(2): 312–23.
- Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, et al. (2013) Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol* 158(10): 2059–68.
- Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, Monroe SS, Glass RI (1999) Identification of a distinct common strain of “Norwalk-like viruses” having a global distribution. *J Infect Dis* 179(6): 1334–44.
- Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, et al. (2004) Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 363(9410): 682–8.
- Lindsmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, et al. (2008) Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* 5(2): e31.
- Ferreira MS, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MP, et al. (2010) Surveillance of norovirus infections in the state of Rio De Janeiro, Brazil 2005–2008. *J Med Virol* 82(8): 1442–8.
- Donaldson EF, Lindsmith LC, Lobue AD, Baric RS (2008) Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev* 225: 190–211.
- Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, et al. (2007) Epochal evolution of GII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol* 81(18): 9932–41.
- Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, et al. (2009) Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007. *J Infect Dis* 1; 200(5): 802–12.
- Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, White PA (2010) Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog* 6; 6(3):
- Koelle K, Cobey S, Grenfell B, Pascual M (2006) Epochal evolution shapes the phylodynamics of inter-pandemic influenza A (H3N2) in humans. *Science* 314: 1898–1903.
- Wright PJ, Gunesekere IC, Dooltree JC, Marshall JA (1998) Small round-structured (Norwalk-like) viruses and classical human caliciviruses in southeastern Australia, 1980–1996. *J Med Virol* 55(4): 312–20.
- Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI (1998) Molecular epidemiology of “Norwalk-like viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 178(6): 1571–8.
- Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN (1995) Human enteric Caliciviridae: The complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *J Gen Virol* 76: 2349–2355.
- Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Bresce JS, Beard RS, et al. (2004) Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus—United States, 2002. *J Infect Dis* 1; 190(1): 27–36.

21. Larsson MM, Rydell GE, Grahn A, Rodríguez-Díaz J, Akerlind B, et al. (2006) Antibody prevalence and titer to norovirus (genogroups II) correlate with secretor (FUT2) but not with ABO phenotype or Lewis (FUT3) genotype. *J Infect Dis* 194(10): 1422–7.
22. Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, et al. (2010) Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol* 84: 8085–8097.
23. Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Williams K, Lee D, et al. (2011) Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerg Infect Dis* 17(8): 1389–95.
24. Yen C, Wikswo ME, Lopman BA, Vinje J, Parashar UD, et al. (2011) Impact of an emergent norovirus variant in 2009 on norovirus outbreak activity in the United States. *Clin Infect Dis* 53(6): 568–71.
25. van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, et al. (2012) Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill* 3; 18(1): 8–9.
26. Bennett S, MacLean A, Miller RS, Aitken C, Gunson RN (2013) Increased norovirus activity in Scotland in 2012 is associated with the emergence of a new norovirus GII.4 variant. *Euro Surveill* 10; 18(2).
27. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013) Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2009–2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 25; 62(3): 41–7.
28. Parker TD, Kitamoto N, Tanaka T, Hutson AM, Estes MK (2005) Identification of genogroup I and genogroup II broadly reactive epitopes on the norovirus capsid. *J Virol* 79: 7402–7409.
29. Seto Y, Iritani N, Kubo H, Kaida A, Murakami T, et al. (2005) Genotyping of norovirus strains detected in outbreaks between April 2002 and March 2003 in Osaka City, Japan. *Microbiol Immunol* 49: 275–283.
30. Okada M, Tanaka T, Osoto M, Takeda N, Shinozaki K (2006) Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol* 151(8): 1635–41.
31. Belliot G, Kamel AH, Estienney M, Ambert-Balay K, Pothier P (2010) Evidence of emergence of new GGII.4 norovirus variants from gastroenteritis outbreak survey in France during the 2007-to-2008 and 2008-to-2009 winter seasons. *J Clin Microbiol* 48: 994–998.
32. Hall AJ, Wikswo ME, Manikonda K, Roberts VA, Yoder JS, et al. (2013) Acute Gastroenteritis Surveillance through the National Outbreak Reporting System, United States. *Emerg Infect Dis* 19(8): 1305–9.
33. Gallimore CI, Barreiros MA, Brown DW, Nascimento JP, Leite JP (2004) Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 37(3): 321–6.
34. Borges AM, Teixeira JM, Costa PS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, et al. (2006) Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(7): 721–4.
35. Campos GS, Moreau VH, Bandeira A, Barberino G, Almeida PF, et al. (2008) Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. *Arch Virol* 153(6): 1125–9.
36. Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, et al. (2008) Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(2): 201–6.
37. Barreira DM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadovsky AD, et al. (2010) Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J Clin Virol* 47(1): 60–4.
38. Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Ribeiro CD, Calux SJ, et al. (2011) Large gastroenteritis outbreak due to norovirus GII in São Paulo, Brazil, summer 2010. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 53(2): 119–20.
39. Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, et al. (2012) Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994–2008) *PLoS One* 7(3): e33754.
40. Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, de Lucena MS, Siqueira JA, et al. (2013) Norovirus diversity in diarrheic children from an African-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. *PLoS One* 8(2): e56608.
41. Silva LD, Rodrigues EL, Lucena MS, Lima IC, Oliveira DD, et al. (2013) Detection of the pandemic Norovirus variant GII.4 Sydney 2012 in Rio Branco, state of Acre, northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 11; 0: 0.
42. Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, Vieira CB, Xavier Mda P, et al. (2011) Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(8): 942–7.
43. Beuret C, Köhler D, Baumgartner A, Lüthi TM (2002) Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol* 68(4): 1925–31.
44. Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD (2004) Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods* 116: 109–117.
45. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 11; 22(22): 4673–80.
46. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28(10): 2731–9.
47. Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696–704.
48. Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O (2005) PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33: W557–559.
49. Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 55: 539–552.
50. Rambaut A (2009) FigTree v1.3.1: Tree Figure Drawing Tool. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
51. Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.
52. Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25(7): 1253–6.
53. Drummond AJ, Ho SY, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4(5): e88.
54. Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* 22(5): 1185–92.
55. Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, Nakagomi O (2013) Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J Clin Virol* 56(3): 185–93.
56. Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Kerry J, Adigwe J, Gray JJ (2007) Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: emergence and selection of virus variants. *Arch Virol* 152(7): 1295–303.
57. Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, et al. (2008) Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006–2007 norovirus GII/4 epidemic population by genome wide tracing of evolutionary history. *J Virol* 82(22): 11247–62.
58. Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA (2006) Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 44(2): 327–33.
59. Galeano ME, Martínez M, Amarilla AA, Russomando G, Miagostovich MP, et al. (2013) Molecular epidemiology of norovirus strains in Paraguayan children during 2004–2005: description of a possible new GII.4 cluster. *J Clin Virol* 58(2): 378–84.
60. Tu ET, Bull RA, Greening GE, Hewitt J, Lyon MJ, et al. (2008) Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. *Clin Infect Dis* 1; 46(3): 413–20.
61. Siebenga J, Kroneman A, Vennema H, Duizer E, Koopmans M, et al. (2008) Food-borne viruses in Europe network report: the norovirus GII.4 2006b (for US named Minerva-like, for Japan Kobe034-like, for UK V6) variant now dominant in early seasonal surveillance. *Euro Surveill* 10; 13(1).
62. Eden JS, Bull RA, Tu E, McIver CJ, Lyon MJ, et al. (2010) Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008. *J Clin Virol* 49(4): 265–71.
63. Leshem E, Wikswo M, Barclay L, Brandt E, Storm W, et al. (2013) Effects and clinical significance of GII.4 Sydney norovirus, United States, 2012–2013. *Emerg Infect Dis* 19(8): 1231–8.
64. Bok K, Abente EJ, Realpe-Quintero M, Mitra T, Sosnovtsev SV, et al. (2009) Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J Virol* 83(22): 11890–901.
65. Siebenga JJ, Lemey P, Kosakovsky Pond SL, Rambaut A, Vennema H, et al. (2010) Phylodynamic reconstruction reveals norovirus GII.4 epidemic expansions and their molecular determinants. *PLoS Pathog* 6; 6(5): e1000884.
66. Boon D, Mahar JE, Abente EJ, Kirkwood CD, Purcell RH, et al. (2011) Comparative evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period. *J Virol* 85(17): 8656–66.
67. Fernández MD, Torres C, Poma HR, Riviello-López G, Martínez LC, et al. (2012) Environmental surveillance of norovirus in Argentina revealed distinct viral diversity patterns, seasonality and spatio-temporal diffusion processes. *Sci Total Environ* 15; 437: 262–9.
68. Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF, Baric RS (2012) Norovirus immunity and the great escape. *PLoS Pathog* 8(10): e1002921.
69. Lindesmith LC, Beltramello M, Donaldson EF, Corti D, Swanstrom J, et al. (2012) Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. *PLoS Pathog* 8(5).
70. de Rougemont A, Ruvoen-Clouet N, Simon B, Estienney M, Elie Caille C, et al. (2011) Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *J Virol* 85(9): 4057–70.
71. Vicentini F, Denadi W, Gomes YM, Rose TL, Ferreira MS, et al. (2013) Molecular characterization of noroviruses and HBGA from infected Quilombola children in Espírito Santo State, Brazil. *PLoS One* 22; 8(7): e69348.

4.2 Surveillance of Noroviruses in Rio de Janeiro: Occurrence of genogroup IV in clinical and wastewater samples

SURVEILLANCE OF NOROVIRUSES IN RIO DE JANEIRO: OCCURRENCE OF GENOGROUP IV IN CLINICAL AND WASTEWATER SAMPLES

Fioretti JM¹, Fumian TM¹, Rocha MS¹, dos Santos IAL¹, Assis MRS¹, Rodrigues JS¹,
Miagostovich MP¹.

Julia Monassa Fioretti¹, Tulio Machado Fumian¹, Mônica Simões Rocha¹, Ingrid de Arruda Lucena dos Santos¹, Filipe Aníbal Carvalho-Costa²; Matheus Ribeiro de Assis¹, Janaina de Souza Rodrigues¹, Marize Pereira Miagostovich¹

¹ Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratory of Epidemiology and Molecular Systematic, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding author: Fioretti JM, e-mail: juliafior@ioc.fiocruz.br

Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 21040-360, Avenida Brasil, 4365, Rio de Janeiro, Brazil

Tel.: +55 21 2562 1923; fax: +55 21 2560 2921.

ABSTRACT

Norovirus (NoV) genogroup (G) IV has been described infecting humans, although few reports regarding the frequency and spread of this virus result in a lack of information about its clinical significance. The main goal of this study was to investigate the occurrence of GIV NoV in the State of Rio de Janeiro in order to evaluate frequency, concentration and genetic diversity using clinical and environmental approach. For this purpose 316 stool samples were collected from acute gastroenteritis cases reported in a three-year period. Wastewater samples were also obtained from three different points along the main wastewater treatment plant (WWTP) from Rio de Janeiro during one year, totalizing 156 samples. All samples were submitted to quantitative analysis by TaqMan™ real time PCR for GI, GII and GIV NoV. Eighty-seven, out of 316 clinical samples were positive (27.5%) for NoV, of which 78 (89.7%) were GII, 12 GI (13.2%) and three (3.4%) GIV, with viral load ranging from 10^3 to 10^{12} genome copies (CG) per gram. Co-infection with different genogroups was observed in four samples as GI/GII (2), GI/GIV (1) and GI/GII/GIV (1). Regarding wastewater samples, the frequency in raw sewage of GI, GII and GIV was 38.5%, 96.2% and 52%, respectively, with viral load ranging from 10^4 to 10^7 genome copies (CG) per liter. Data revealed higher frequency of GI and GIV NoV in wastewater when compared to clinical samples. This could be due to asymptomatic cases in human population. To our knowledge, this is the first description of GIV NoV in clinical samples in Brazil. These results demonstrate the importance of carrying out an active laboratory surveillance including an environmental approach in order to assist the epidemiology of the virus that have neglected diagnosis or have not yet determined their impact on the population studied.

INTRODUCTION

Human norovirus is estimated to be associated with 18% of all diarrheal disease and the major causative agent of acute gastroenteritis (AGE) outbreaks worldwide (Ahmed et al., 2014). The genus *Norovirus* (NoV) belongs to the *Caliciviridae* family, which comprises nonenveloped viruses with an icosahedral symmetry that are approximately 27 – 30 nm in diameter. The NoV genome is organized into three open reading frames (ORF), with ORF1 encoding six non-structural proteins, including the RNA-dependent RNA-polymerase, ORF2 encoding the structural protein VP1 that composes the viral capsid, and ORF3 encoding the structural protein VP2. Based on the amino acid sequence of VP1, NoV has been classified into six genogroups (GI to GVI), and further subdivided into at least 36 genotypes (Zheng et al., 2006; Kroneman et al., 2013). GI, GII and GIV NoV have been described infecting humans, and outbreaks are mainly caused by GII (Kroneman et al., 2008). While majority epidemiological data report the occurrence of GI and GII, few studies have described the occurrence and spread of GIV from clinical and environmental samples worldwide (van den Berg et al., 2005; La Rosa et al., 2008; 2010; Haramoto et al., 2008; Kitajima et al., 2010; Di Martino et al., 2014).

In Brazil, studies regarding NoV molecular epidemiology have been focusing in GI and GII (Victoria et al., 2007; Fioretti et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Aragão et al., 2013; Vicentini et al., 2013; de Andrade et al., 2014), and until now, there has been only one study describing the detection of GIV NoV in environmental samples from Amazon region (Teixeira et al., 2016). Therefore, there is a lack of information concerning the prevalence of this genogroup in clinical specimens and its dissemination in environmental waters. The aim of this study was demonstrate the occurrence and impact of GIV NoV infections in AGE cases occurred in the

metropolitan area of Rio de Janeiro, evaluating the frequency and distribution of those viruses in clinical and environmental samples, as well as the main genogroups that infect humans, as GI and GII NoV.

MATERIAL AND METHODS

Clinical samples

A total of 316 stool samples were obtained by spontaneous demand of inpatients (n = 192) and outpatients (n = 124) from AGE outbreaks or sporadic cases attended in public health centers, including hospitals and the central laboratory of Rio de Janeiro State during 2012 and 2014. Samples obtained were from age groups, including children less than one year old and elderly people (< 81 years). All samples were previously tested negative for rotavirus. This study was approved by the Ethics Committee of FIOCRUZ (CEP number: 311/06).

Wastewater samples

Wastewater samples were obtained from the largest urban wastewater treatment plant (WWTP) of Rio de Janeiro State, which receives 5000 l s⁻¹ of wastewater from approximately 1.5 million inhabitants. The treatment procedure employs an aerobic process using conventional activated sludge and the final effluent, without chlorinating, is discharged into the Guanabara Bay (area of 380 km²). Wastewater samples were collected from three points of the WWTP: influent (untreated wastewater), primary and secondary effluents. The primary effluent was collected from the preliminary treatment, which process consists of a grid separation followed by a primary sedimentation at a hydraulic retention time (HRT) of two hours

(h). The secondary effluent sample was obtained after the activated sludge process treatment, consisting of an aeration of primary effluent in tanks for five h followed by secondary sedimentation with an HRT of four h. The secondary effluent is not chlorinated, and is discharged into the water environment.

Samples were collected weekly for a period of one year (May/2013 to May/2014) totalizing 156 samples, 52 from each point (influent, primary and secondary effluent). At each sampling point, 500 ml of wastewater was collected in sterile plastic bottles, stored at 4 °C and transported to the laboratory for immediate analysis.

Virus concentration method

A low-cost methodology based on the adsorption of viruses to preflocculated skimmed-milk proteins was used for NoV concentration from wastewater (Calgua et al., 2013). Before the concentration step, all samples were spiked with a known concentration of PP7 bacteriophage, used as an internal control in order to avoid false negative results, and the extracted RNA was diluted 10-fold.

Recovery efficiency of the concentration method

To determine the recovery efficiency of the flocculation method used, known concentrations of NoV GII were spiked in influent, primary and secondary effluent samples. For each type of sample, part of the same sample was used as negative control without virus spiking. All assays for viral recovery were carried out in triplicate for each type of wastewater.

RNA extraction and cDNA synthesis

Viral nucleic acid was extracted from 140 µl of a 20% fecal suspensions or wastewater concentrated samples using the QIAamp Viral RNA™ Mini Kit (QIAGEN,

Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. The cDNA synthesis was carried out using a pd(N)₆TM random primer (Amersham Biosciences, UK) and the SuperscriptTM III RNase H Reverse kit (Invitrogen, USA).

NoV detection and quantification

A TaqMan®-Real Time PCR assay was used for quantitative detection of GIV NoV using primers and probe previously described (Trujillo et al., 2006) for both clinical and environmental samples. For detection of GI and GII NoV, different protocols were used mainly for clinical samples obtained during 2012 and 2013. Those samples were previously submitted to conventional PCR using primers that amplify a region in the polymerase gene (Beuret et al., 2002) and then to a TaqMan-based qPCR assay previously described (Kageyama et al., 2003) to quantitative analyzes. Clinical samples collected in 2014 and all wastewater samples were directly processed to quantitative analyzes.

QPCR reactions were performed on an Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A 10-fold serial dilution of plasmids containing the ORF1/2 junction of each genogroups were used to generate a standard curve for virus quantification. The genome copies per gram of stool sample (gc g^{-1}) or liter (gc l^{-1}) of wastewater were determined by adjusting the values according to the volumes used for each step of the procedure (virus concentration/fecal suspension, extraction, cDNA synthesis and qPCR reaction). Undiluted and tenfold dilutions of the nucleic acid extract of sewage samples were analyzed in duplicate (4 runs/sample).

GIV NoV molecular characterization and phylogenetic analysis

For GIV NoV phylogenetic analysis a seminested-PCR was performed targeting the 5'-end ORF2 region (Kitajima et al., 2010). Amplicons were purified and sequenced using an ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit® and the ABI Prism 3130xl DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Following the chromatograms analyses, consensual sequences were obtained using BioEdit (Hall 1999). A phylogenetic dendrogram was constructed by the neighbour-joining method using a matrix of genetic distances established under the Kimura-two parameter model using MEGA v.6.0.6 (Tamura et al. 2013).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v. 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Viral load concentration of NoV GI, GII and GIV in wastewater (influent, primary and secondary effluent) and clinical samples were analyzed for significant differences using Mann–Whitney U test. Frequencies of NoV detection in wastewater and clinical samples were compared through the Fisher`s exact test. A p-value inferior to 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Clinical samples

Eighty-seven out of 316 clinical samples were positive (27.5%) for NoV, being 78 for GII, 12 for GI and three for GIV. The NoV positivity rate during 2012, 2013 and 2014 were 32.7%, 18.5% and 34.4%, respectively. Viral loads of GI, GII and GIV NoV in stool samples ranged from 7.1×10^3 to 6.56×10^{12} gc g⁻¹ (Table 1). NoV frequencies were 33.1% (41/124) and 24% (46/192) in out and inpatients, respectively. No significant difference was observed when comparing the viral loads and frequencies of NoV between those patients ($p > 0.05$). The detection rates were higher in children aged up to 11 months [25/83 (30.1%)] and in patients over 12 years [32/85 (37.6%)], but only the last was significantly higher when compared with groups of 12 – 23 months, 24 – 48 months and 49 – 144 months ($p < 0.05$) (Table 2). Co-infections were observed in four samples being two with GI/GII, one with GI/GIV and one with GI/GII/GIV.

NoV detection rate was significantly higher ($p < 0.001$) during the winter season [37/65 (56.9%)] when compared to those collected in autumn [19/115 (16.5%)], spring [5/58 (13.8%)] and summer [23/78 (29.5%)].

Table 1: Detection and quantification of GI, GII and GIV norovirus in clinical samples tested during 2012 – 2014

Year	GI		GII		GIV		Total of positive/ Tested (%)
	Quantification Range (gc g ⁻¹)	Positive/ Tested (%)	Quantification Range (gc g ⁻¹)	Positive/ Tested (%)	Quantification Range (gc g ⁻¹)	Positive/ Tested (%)	
2012	2.6 × 10 ⁶	2/119 (1.7)	1.8 × 10 ⁴	39/119 (32.8)	–	0/119	39/119 (32.7)
	– 5.8 × 10 ⁸		– 1.1 × 10 ¹²				
2013	7.1 × 10 ³	9/130 (6.9)	2.9 × 10 ⁴	17/130 (13.1)	1.5 × 10 ⁴	3/130 (2.3)	24/130 (18.5)
	– 1.0 × 10 ⁹		– 9.6 × 10 ¹⁰		– 1.2 × 10 ⁶		
2014	9.6 × 10 ³	1/64 (1.6)	1.6 × 10 ⁴	22/64 (34.4)	–	0/64	22/64 (34.4)
			– 2.6 × 10 ¹⁰				
Total	–	12/316 (3.8)	–	78/316 (24.7)	–	3/316 (0.9%)	87/316 (27.5)

Table 2: NoV positivity by age group

Age group (months)	Positive/ Tested (%)
0 – 11	25/83 (30.1)
12 – 23	12/55 (21.8)
24 – 48	11/56 (19.6)
49 – 144	7/37 (18.9)
> 144	32/85 (37.6)*

Environmental samples

The overall analysis of the 156 wastewater samples, detected GI in 42 (27%), GII in 103 (66%) and GIV in 53 (34%). The GII frequency in influent and primary effluents samples (96.2%) [(50/52), (50/52)] showed statistically significant difference when comparing to GI (38.5 – 40.4%) [(20/52), (21/52)] and GIV (52 – 48%) [(27/52), (25/52)] frequencies (p < 0.001). In secondary samples, a clear reducing (p < 0.001)

in frequency was observed in all genogroups, being 1/52 (1.9%) for GI, 3/52 (5.8%) for GII and 1/52 (1.9%) for GIV.

Wastewater analyzes by qPCR revealed higher ($p < 0.001$) viral concentration median of GII in influent (2.4×10^6 gc l⁻¹) and primary effluent samples (1.9×10^6 gc l⁻¹), when compared to GI ($1.9 \times 10^5 - 9.7 \times 10^4$ gc l⁻¹) and GIV ($5.0 \times 10^5 - 6.2 \times 10^5$ gc l⁻¹), respectively (Figure 1).

The frequency and viral load of GI, GII and GIV in raw sewage exhibited different seasonality profiles, being GII present in all seasons, while GI was detected more frequently and in higher concentration in autumn and GIV in winter and summer ($p < 0.05$) (Figure 2).

Bacteriophage PP7, used as an internal control, was detected in 100% of all wastewater samples. The mean value of GII NoV recovery rate, used as positive control, was 102% (11.2 – 269.8%).

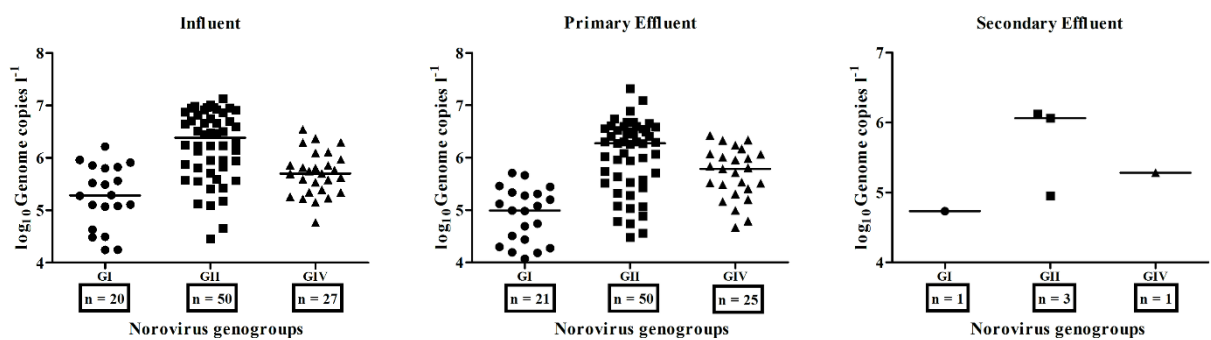


Figure 1: Norovirus genogroups (G) I, II and IV concentrations in influent, primary and secondary effluent samples.

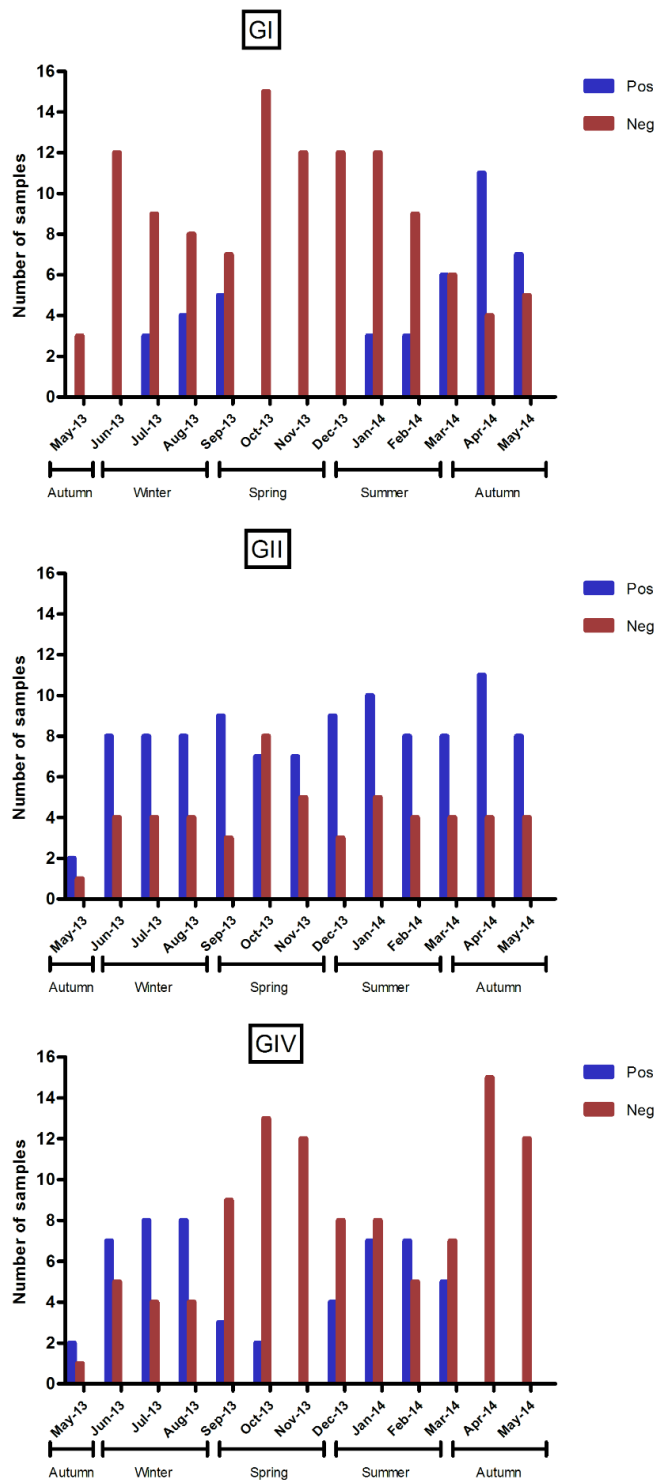


Figure 2: Distribution of norovirus genogroups I, II and IV in influent samples according to the seasons of the year.

Molecular characterization of GIV detected in clinical and environmental samples

Twenty-seven GIV NoV obtained from clinical (2) and environmental (25) samples were characterized as GIV by phylogenetic analysis of partial sequence (302 nucleotides) of the VP1 gene (capsid). Nucleotide identities among sewage and clinical samples ranged from 99.3 to 100% (Figure 3).

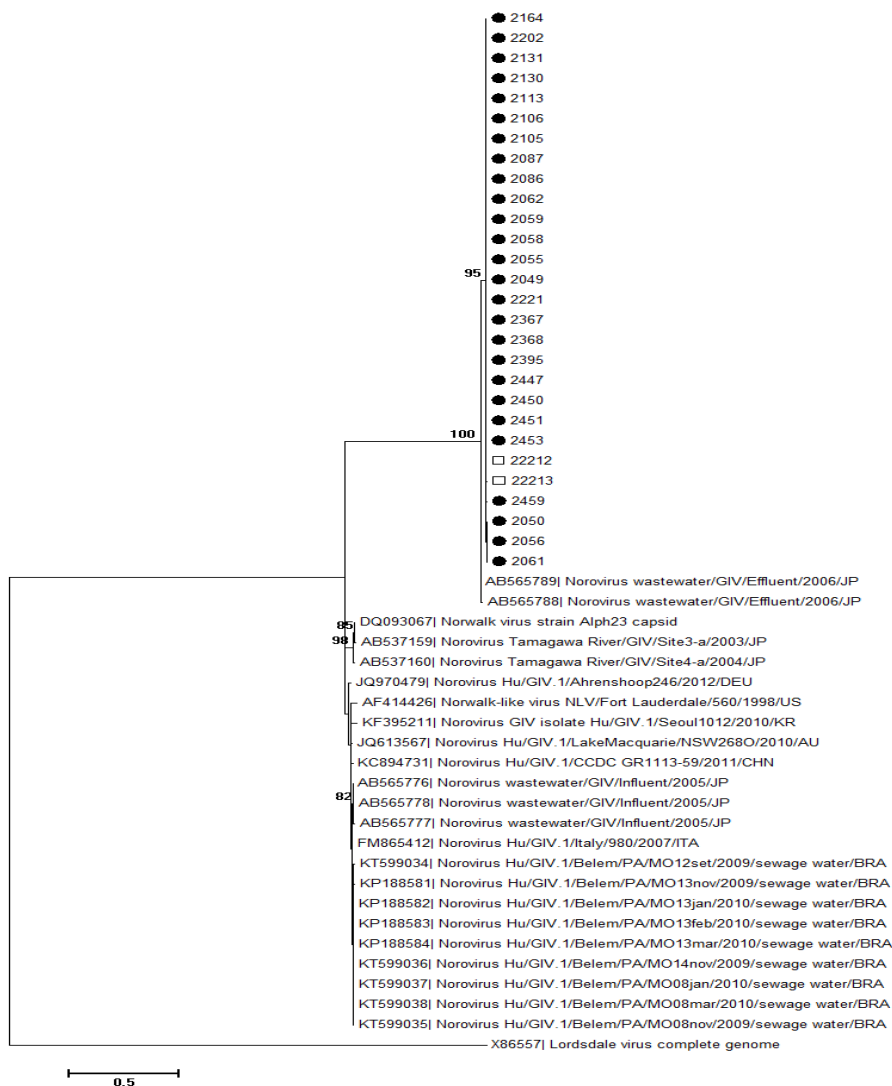


Figure 3: Phylogenetic tree of norovirus genogroup IV (GIV NoV) strains based on 302 nucleotides of partial capsid gene sequences. Strains collected from sewage samples are marked with a filled circle and clinical samples are marked with unfilled square.

DISCUSSION

The present study demonstrated data regarding the occurrence of NoV in the great metropolitan region of the State of Rio de Janeiro. This was the first study in the country that described the occurrence of GIV NoV from clinical samples. Recently, GIV NoV was reported in North region of Brazil in environmental samples. (Teixeira et al., 2016). GIV NoV was the less frequent genogroup obtained in clinical samples, although it was the second most detected in environmental samples, after GII NoV.

Analyzing the overall NoV results from clinical samples, the mean positivity rate was 27.5% of tested cases and a marked seasonality in the winter months. An eight-year NoV surveillance performed in South of Brazil demonstrated a clear winter-spring seasonality in this region (de Andrade et al., 2014), while in West Central region a higher NoV prevalence was observed in rainy season (September to March) (Borges et al., 2006). Recently, Fumian et al. (2016) also observed an increase of NoV prevalence during the rainy season, however it was not analyzed samples collected during winter and autumn.

In wastewater samples, GII NoV was present during all the period analyzed (May/2013 to May/2014), while GI was detected more frequently and in higher concentration in autumn and the GIV in winter and summer. Victoria et al. (2010), observed higher NoV concentration in colder months during 2005 in wastewater collected from a WWTP in Rio de Janeiro. A study conducted in United States demonstrated that the concentration of these three genogroups varied along the period studied, but were not higher during the winter months (Kitajima et al., 2014). Another studies conducted in temperate-zone countries, also demonstrate higher concentration of NoV in samples collected during winter season (Haramoto et al., 2006; Kitajima et al., 2009, 2012; Katayama et al., 2008; Pérez-Sautu et al., 2012).

NoV viral loads in clinical samples ranged from 10^3 to 10^{12} CG g^{-1} , with no statically difference in GI and GII viral loads between inpatients and outpatients. Epidemiological studies comparing the NoV quantification in stool samples did not demonstrate a positive correlation with the severity of disease (Barreira et al., 2010; González et al., 2011).

Concerning age groups affected, a higher detection rate was observed in older children and adults (> 12 years), which is in accordance with a previous study conducted in Southern region of Brazil that demonstrated higher incidence in older age groups (de Andrade et al., 2014).

Out of the three clinical samples detected positive for GIV, two presented co-infection with GI and GI/GII. Thus, we could not infer if the AGE case could be associated with GIV infection in the patients affected. In Bangladesh, patients with diarrheal disease, presented co-infection with the three genogroups (GI, GII and GIV) in 11% of NoV positive cases and 2% presented infection with only GIV (Rahman et al. 2016).

A higher positivity percentage (34%) of GIV NoV observed in environmental samples when compared to clinical samples (0.9%) was similar with a study performed in Italy, where the positivity for GIV in untreated samples (21.8%) was seven times higher when compared with diarrhea cases collected from hospitalized patients (3.2%) (Muscillo et al., 2013). These results may suggest the association with asymptomatic cases in GIV infection. Nevertheless, is important to notice that as AGE is not a severe disease in adults, many cases are not notified, which could also explain the higher prevalence in untreated wastewater but not in clinical samples.

Regarding wastewater samples, our results demonstrated that the positivity rate of GII in influent (96.2%) was higher when compared to GI (38.5%) and GIV (52%). Fumian et al., (2013) detected GII NoV in 55% of the influent samples but did not

detected GI from this same WWTP during the period 2009 – 2010. In a study conducted in different regions of Uruguay, Victoria et al. (2016) observed rate frequencies varying from 17 – 42% for GI and 46 – 100% for GII in raw sewage samples. In Japan, GI and GII were positive in all influent samples tested from WWTP during the periods of 2003/2004 and 2005/2006 (Haramoto et al., 2006; Kitajima et al., 2012). Regarding GIV in untreated wastewater, studies demonstrate positivity rate varying from 16.7% in Brazil (North region) (Teixeira et al., 2015), 21.8% in Italy (Muscillo et al., 2013), 50% in Japan (Kitajima et al., 2009) and 67% in United States (Kitajima et al., 2014).

Quantitative analyzes of raw sewage samples ranged from 10^4 to 10^7 gc l⁻¹ for GII and 10^4 – 10^6 gc l⁻¹ for GI and GIV. These results are similar with data reported in Sweden and Uruguay, where GI and GII concentration in raw sewage varied from 10^3 to 10^7 gc l⁻¹ (Nordgren et al., 2009; Victoria et al., 2014). The untreated wastewater samples concentrations of GII was statically significant higher when compared to GI and GIV concentrations. GII has been the described as the most prevalent genogroup associated to AGE outbreaks and in wastewater worldwide (Lodder and de Roda Husman, 2005; Haramoto et al., 2006; Katayama et al., 2008; Bucardo et al., 2008; Kroneman et al., 2008).

A similar reduction in the detection rate of these viruses in the final effluent was observed by Fumian et al (2013) in this same WWTP, confirming that the activated sludge treatment is able to reduce the NoV load. A physical removal process, such as activated sludge used in the WWTP studied, is able to remove about 90 – 99% of virus load (between 1 and 2 logs) in the wastewater (Ueda & Horan 2004), and reduce NoV concentrations to non-detectable levels in effluent samples.

The molecular characterization confirmed the circulation of GIV NoV in both clinical and environmental samples, which grouped into the same cluster containing

Japanese strains. Nucleotide identities among sewage and clinical samples varied from 99.3 to 100%, which may suggest the circulation of the same strain in human and environment.

The data obtained in this study demonstrate the importance of laboratorial surveillance in AGE cases combined with environmental approach in order to understand the impact of new virus infection in a given population. The continuous monitoring of viral infections provides NoV genetic diversity data required to assess the necessity for introduction of an anti-norovirus vaccine.

Acknowledgement

We kindly thank to Peter White, from the School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Faculty of Science, University of New South Wales, Sydney, Australia for the generous provision of plasmids that contained the GIV NoV genome. The project was financially supported by Faperj (E-26/102.845/2012) and CNPq. This research study is under the scope of the activities of Fiocruz as a Collaborating Center of PAHO/WHO of Public and Environmental Health.

REFERENCES

Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, Koopmans M, Lopman BA. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2014; 14(8):725-30.

Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, de Lucena MS, Siqueira JA, Fumian TM, Hernandez Jd, de Oliveira CS, Oliveira Dde S, Araújo Eda C, Soares Lda S,

Linhares AC, Gabbay YB. Norovirus diversity in diarrheic children from an African-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. *PLoS One*. 2013; 8(2):e56608.

Barreira DM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadovsky AD, Leite JP, Miagostovich MP, Spano LC. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J Clin Virol*. 2010; 47(1):60–64

Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Lüthi TM. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(4):1925-31.

Borges AM, Teixeira JM, Costa PS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco Rde C, Brito WM, Leite JP, Cardoso Dd. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(7):721-4.

Calgua B, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Suñen E, Calvo M, Bofill-Mas S, Girones R. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J Virol Methods*. 2013 Feb;187(2):215-21.

de Andrade Jda S, Rocha MS, Carvalho-Costa FA, Fioretti JM, Xavier Mda P, Nunes ZM, Cardoso J, Fialho AM, Leite JP, Miagostovich MP. Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. *J Clin Virol*. 2014; 61(3):345-52.

Di Martino B, Di Profio F, Ceci C, Di Felice E, Green KY, Bok K, De Grazia S, Giammanco GM, Massirio I, Lorusso E, Buonavoglia C, Marsilio F, Martella V. Seroprevalence of norovirus genogroup IV antibodies among humans, Italy, 2010-2011. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(11):1828-32.

Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM, de Assis RM, Carvalho Costa FA, de Oliveira SA, Leite JP, Miagostovich MP. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994 2008). *PLoS One*. 2012; 7(3):e33754.

Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, Vieira CB, Xavier Mda P, Leite JP, Miagostovich MP. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106(8):942-7.

Fumian TM, Vieira CB, Leite JP, Miagostovich MP. Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health*. 2013; 11(1):110-9.

Fumian TM, Leite JP, Rocha MS, de Andrade JS, Fioretti JM, de Assis RM, Assis MR, Fialho AM, Miagostovich MP. Performance of a one-step quantitative duplex RT-PCR for detection of rotavirus A and noroviruses GII during two periods of high viral circulation. *J Virol Methods*. 2016; 228:123-9

González GG, Liprandi F, Ludert JE. Molecular epidemiology of enteric viruses in children with sporadic gastroenteritis in Valencia, Venezuela. *J Med Virol*. 2011; 83(11):1972-82.

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.

Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Yamashita H, Tajima A, Nakajima H, Ohgaki S. Seasonal profiles of human noroviruses and indicator bacteria in a wastewater treatment plant in Tokyo, Japan. *Water Sci Technol*. 2006; 54(11-12):301-8.

Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 253:1-8.

Hassine-Zafrane M, Sdiri-Loulizi K, Kaplon J, Ben Salem I, Pothier P, Aouni M, Ambert-Balay K. Molecular detection of human noroviruses in influent and effluent samples from two biological sewage treatment plants in the region of Monastir, Tunisia. *Food Environ Virol*. 2014 Jun;6(2):125-31.

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; 41(4):1548-57

Katayama H, Haramoto E, Oguma K, Yamashita H, Tajima A, Nakajima H, Ohgaki S. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res.* 2008; 42(6-7):1441-8.

Kitajima M, Haramoto E, Phanuwat C, Katayama H, Ohgaki S. Detection of genogroup IV norovirus in wastewater and river water in Japan. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 49(5):655-8.

Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. *Environ Sci Technol.* 2010; 44(18):7116-22.

Kitajima M, Haramoto E, Phanuwat C, Katayama H, Furumai H. Molecular detection and genotyping of human noroviruses in influent and effluent water at a wastewater treatment plant in Japan. *J Appl Microbiol.* 2012; 112(3):605-13.

Kitajima M, Iker BC, Pepper IL, Gerba CP. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes--identification of potential viral indicators. *Sci Total Environ.* 2014; 488-489:290-6.

Kroneman A, Verhoef L, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y, et al. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol* 2008; 46(9):2959-65.

La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Muscillo M. Detection of genogroup IV noroviruses in environmental and clinical samples and partial sequencing through rapid amplification of cDNA ends. *Arch Virol.* 2008; 153(11):2077-83.

La Rosa G, Iaconelli M, Pourshaban M, Fratini M, Muscillo M. Molecular detection and genetic diversity of norovirus genogroup IV: a yearlong monitoring of sewage throughout Italy. *Arch Virol.* 2010; 155(4):589-93.

Lodder WJ, de Roda Husman AM. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(3):1453-61.

Muscillo M, Fratini M, Graffeo R, Sanguinetti M, Martella V, Green KY, Della Libera S, La Rosa G. GIV Noroviruses in Wastewaters and in Stool Specimens from Hospitalized Patients. *Food Environ Virol.* 2013; DOI: 10.1007/s12560-013-9121-5

Nordgren J, Matussek A, Mattsson A, Svensson L, Lindgren PE. Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Res.* 2009; 43(4):1117-25.

Pérez-Sautu U, Sano D, Guix S, Kasimir G, Pintó RM, Bosch A. Human norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment, Spain. *Environ Microbiol.* 2012; 14(2):494-502.

Rahman M, Rahman R, Nahar S, Hossain S, Ahmed S, Golam Faruque AS, Azim T. Norovirus diarrhea in Bangladesh, 2010-2014: prevalence, clinical features, and genotypes. *J Med Virol.* 2016 Oct;88(10):1742-50.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12):2725-9.

Teixeira DM, Hernandez JM, Silva LD, Oliveira Dde S, Spada PK, Gurjão TC, Mascarenhas JD, Linhares AC, Morais LL, Gabbay YB. Occurrence of Norovirus GIV in Environmental Water Samples from Belém City, Amazon Region, Brazil. *Food Environ Virol.* 2016; 8(1):101-4.

Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, Ando T, Glass RI, Monroe SS. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(4):1405-12.

Ueda, T. & Horan, N. J. Fate of indigenous bacteriophage in a membrane bioreactor. *Water Res.* 2004; 34, 2151–2159.

van den Berg H, Lodder W, van der Poel W, Vennema H, de Roda Husman AM. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Res Microbiol.* 2005; 156(4):532-40.

Vicentini F, Denadai W, Gomes YM, Rose TL, Ferreira MS, Le Moullac-Vaidye B, Le Pendu J, Leite JP, Miagostovich MP, Spano LC. Molecular characterization of noroviruses and HBGA from infected Quilombola children in Espírito Santo State, Brazil. *PLoS One.* 2013; 8(7):e69348.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich M. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26(7):602-6.

Victoria M, Guimarães FR, Fumian TM, Ferreira FF, Vieira CB, Shubo T, Leite JP, Miagostovich MP. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health.* 2010; 8(1):158-65.

Victoria M, Fumian TM, Rocha MS, Dalmao F, Leite JP, Girones R, Miagostovich MP. Gastroenteric virus dissemination and influence of rainfall events in urban beaches in Brazil. *J Appl Microbiol.* 2014a;117(4):1210-8.

Victoria M, Tort LF, García M, Lizasoain A, Maya L, Leite JP, Miagostovich MP, Cristina J, Colina R. Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food Environ Virol.* 2014b; 6(2):116-24.

Victoria M, Tort LF, Lizasoain A, García M, Castells M, Berois M, Divizia M, Leite JP, Miagostovich MP, Cristina J, Colina R. Norovirus molecular detection in Uruguayan sewage samples reveals a high genetic diversity and GII.4 variant replacement along time. *J Appl Microbiol.* 2016; 120(5):1427-35.

Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53:373–381.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006; 346:312-323.

4.3 Occurrence of human sapoviruses in wastewater and stool samples in Rio de Janeiro, Brazil

ORIGINAL ARTICLE

Occurrence of human sapoviruses in wastewater and stool samples in Rio De Janeiro, Brazil

J.M. Fioretti¹, M.S. Rocha¹, T.M. Fumian¹, A. Ginuino¹, T.P. da Silva¹, M.R. de Assis¹, J.de.S. Rodrigues¹, F.A. Carvalho-Costa² and M.P. Miagostovich¹

¹ Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

² Laboratory of Epidemiology and Molecular Systematic, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Keywords

Brazil, diarrheal disease, genotypes, sapovirus, wastewater.

Correspondence

Julia Monassa Fioretti, Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 21040-360, Avenida Brasil, 4365, Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail: juliafior@ioc.fiocruz.br

2016/0966: received 5 May 2016, revised 8 June 2016 and accepted 13 June 2016

doi:10.1111/jam.13205

Abstract

Aim: To determine the prevalence and molecular epidemiology of human sapovirus (SaV) in both wastewater and stool samples in a 3-year (2012–2014) surveillance study performed in Rio de Janeiro State, Brazil.

Methods and Results: A total of 156 wastewater and 341 stool samples were analysed using quantitative real-time PCR. SaV was detected in 3.5% (12/341) in stool samples with virus load concentrations ranging from 10^4 to 10^9 genome copies per gram ($gc\ g^{-1}$), and in 33.0% (51/156) wastewater samples, with range concentration varying from 10^4 to $10^6\ gc\ l^{-1}$. Partial genome sequencing of wastewater and stool samples revealed the circulation of genotypes GI.1, GI.2, GI.6, GII.1 and GV.1.

Conclusion: This study demonstrated the prevalence of human SaV in acute gastroenteritis (AGE) cases and revealed, for the first time, the environmental dissemination of those viruses in Brazil.

Significance and Impact of the Study: SaV diagnosis should be considered in hospitalized children with AGE and the higher positive rate detection in environmental samples suggests that SaV infection could be underestimated or associated with asymptomatic cases.

Introduction

Sapoviruses (SaVs), first described in Japan in the late 1970s, belong to the *Sapovirus* genus within the Caliciviridae family, and are considered an important causative agent of acute gastroenteritis (AGE) in humans (Chiba *et al.* 1979; Svraka *et al.* 2010). Those viruses are nonenveloped, possess a single-stranded, positive-sense RNA genome of 7–8 kb in length and a 3'-end poly(A) tail with two or three open reading frames (ORF) (Green 2013). Based on the complete capsid gene sequence, SaVs are classified into five genogroups (GI–GV), with GI, GII, GIV and GV described as infecting humans. Recently, nine additional genogroups (GVI–GXIV) have been proposed (Scheuer *et al.* 2013). Genogroups I and II are each further divided, through phylogenetic analysis of the complete capsid gene, into seven genotypes, GI.1–GI.7 and GII.1–GII.7 (Oka *et al.* 2012; Scheuer *et al.* 2013).

Human SaVs have been described in sporadic outbreaks of AGE cases worldwide with a detection rate ranging from 2.2 to 22.6% (Nakata *et al.* 1998; Lee *et al.* 2012; Liu *et al.* 2015; Page *et al.* 2016). They have also been detected in environmental samples, such as wastewater, river water and bivalves (Kitajima *et al.* 2010, 2011; Iizuka *et al.* 2013).

In Brazil, there are few reports that demonstrate the occurrence of those viruses in stool samples from symptomatic and asymptomatic cases of AGE (Xavier *et al.* 2009; Aragão *et al.* 2013; Marques Mendanha de Oliveira *et al.* 2014). Therefore, this study aimed to demonstrate the occurrence of human SaV in the state of Rio de Janeiro, combining data from stool and environmental samples. To our knowledge no similar study using an environmental approach to assess SaV prevalence has yet been conducted in Brazil.

Material and methods

Studied area

This study was conducted in the State of Rio de Janeiro, which is the third most populous state of Brazil, with 8.1% of the total population of Brazil (IBGE 2014). The greater metropolitan region of the state includes the capital, Rio de Janeiro City, and 17 other municipalities (IBGE 2007). Approximately 60% of the resident population in the state of Rio de Janeiro is concentrated in the hydrographic basin of Guanabara Bay, which is an ecosystem that surrounds a large part of the city, including the ports.

Stool samples

During January 2012 to December 2014 a total of 341 stool samples were collected, 212 of which were from hospitalized children and 129 from outpatients with AGE cases occurred in the state of Rio de Janeiro. Samples were received through spontaneous demand at the Laboratory of Comparative and Environmental Virology, IOC – FIOCRUZ, and are included in an ongoing official surveillance programme carried out by the Brazilian Ministry of Health that covers diagnosis, surveillance and molecular epidemiology of viruses that cause AGE. Samples were from age groups ranging from under 1 to 84 years old, and all were previously tested for rotavirus and norovirus, presenting negative results for both viruses. This study was approved by the Ethics Committee of FIOCRUZ (CEP number: 311/06).

Wastewater samples

Wastewater samples were obtained from the largest urban wastewater treatment plant (WWTP) (ETE-Alegria) of Rio de Janeiro State, which receives 5000 l s^{-1} of wastewater from approx. 1.5 million inhabitants. The treatment procedure employs an aerobic process using conventional activated sludge and the final effluent, without chlorinating, is discharged into the Guanabara Bay (area of 380 km^2). Wastewater samples were collected from three points of the WWTP: influent (untreated wastewater), primary and secondary effluents. The primary effluent was collected from the preliminary treatment, a process which consists of a grid separation followed by a primary sedimentation at a hydraulic retention time (HRT) of 2 h. The secondary effluent sample was obtained after the activated sludge process treatment, consisting of an aeration of the primary effluent in tanks for 5 h followed by secondary sedimentation with an HRT of 4 h. The secondary effluent is not chlorinated, and is discharged into

the water environment. Samples were collected weekly for a period of 1 year (May/2013 to May/2014) totalling 156 samples, 52 from each point (influent, primary and secondary effluent). At each sampling point, 500 ml of wastewater was collected in sterile plastic bottles, stored at 4°C and transported to the laboratory for immediate analysis.

Virus concentration method

A low-cost methodology for concentration of wastewater described by Calgua *et al.* (2013) was used. The flocculation method employed is based on the adsorption of viruses to preflocculated skimmed-milk proteins, followed by a final elution of the viruses with phosphate buffer pH 7.5. Before the concentration step, all samples were spiked with a known concentration of PP7 bacteriophage, used as an internal control to avoid false-negative results, and the extracted RNA was diluted 10-fold. PP7 was detected by quantitative PCR (qPCR) as previously described by Rajal *et al.* (2007).

RNA extraction and cDNA synthesis

Viral RNA was extracted from $140 \mu\text{l}$ of concentrated and faecal samples using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN[®], Valencia, CA) to obtain a final volume of $60 \mu\text{l}$, according to the manufacturer's protocol. The synthesis of complementary DNA was carried out using a random primer, pd(N)6 (Amersham Biosciences, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK) and Super Script III (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA) for reverse transcription.

SaV detection and characterization

For stool and wastewater samples, the quantitative analyses were performed using the TaqMan[™]-based real-time PCR protocol, which amplifies the most conserved region of the genome, the polymerase-capsid junction localized in ORF1, of all human SaV (GI, GII, GIV and GV) in a single reaction, previously described by Oka *et al.* (2006). All samples were tested in duplicate, and were considered positive when the fluorescence intensity crossed the threshold line until 40 cycles. A 10-fold serial dilution of a plasmid containing the polymerase-capsid junction of SaV was used to generate a standard curve for virus quantification. The genome copies per litre (gc l^{-1}) of wastewater or per gram of stool sample were determined by adjusting the values according to the volumes that had been used for each step of the procedure (virus concentration/faecal suspension, extraction, cDNA synthesis and qPCR reaction).

For molecular characterization, all positive samples were submitted for seminested-PCR using primers that amplify the capsid region, previously described by Kitajima *et al.* (2010). The amplicons obtained were purified using the QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN[®]), following the manufacturer's recommendations, and quantified using a spectrophotometer (Qubit[®], Carlsbad, CA, USA). DNA sequencing was performed using the dideoxynucleotide chain termination method with the ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 1, v. 3.1 and the ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (both from Applied Biosystems, Foster City, CA,) by the genomic platform of DNA sequencing PDTIS/FIOCRUZ.

Phylogenetic analysis

Sequence editing and multiple alignments were performed with the BIOEDIT SEQUENCE EDITOR 7.0 software (Hall 1999). Phylogenetic trees were constructed by the neighbour-joining method based on the Kimura two-parameter model (Kimura 1980) using the MEGA v.6.0.6 software package (Tamura *et al.* 2013). Confidence values of the internal nodes were calculated by performing bootstrap analyses with 1000 replicates.

For phylogenetic analysis, the samples sequenced were compared to previous SaV strains identified by sequencing the capsid region and retrieved from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Reference sequences included in the phylogenetic tree were representative of all SaV genogroups and genotypes described. The nucleotide sequences obtained in this study were submitted to the National Center for Biotechnology Information (GenBank, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) and received the following accession numbers: KU512720–KU512736.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GRAPHPAD PRISM v. 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). Viral load concentration of human SaV in wastewater samples

(influent and primary effluent) as well as in stool samples (inpatients and outpatients) were analysed for significant differences using Mann–Whitney *U* test. Frequencies of SaV detection in inpatients and outpatients, during the 3 years (2012–2014), as well as in environmental samples obtained in distinct seasons were compared through the Fisher's exact test. A *P*-value inferior to 0.05 was considered statistically significant.

Results

From a total of 341 stool samples tested, 12 were positive (3.5%) for human SaV with a percentage ranging from 1.6 to 5.1% in the 3 years studied. Among the positive samples, 75% (9/12) were from hospitalized children and 25% from outpatients. Differences in frequency of detection during the 3 years studied, as well as among inpatients and outpatients was not statistically significant ($P > 0.05$). Virus load concentration ranged from 1.3×10^4 to 3.2×10^9 gc g⁻¹ and no case of co-infection with noroviruses and rotaviruses was detected. The comparison of virus load concentrations in inpatients and outpatients was not statistically significant ($P > 0.05$) (Table 1). The distribution of positive cases by age group revealed three cases under 1 year, seven $\geq 1 \leq 5$ years, and, two $> 5 \leq 16$ years. No human SaV was detected in samples collected from patients over 16 years of age.

Environmental samples analysis demonstrated 51 positive samples out of the 156 tested (33.0%), of which 25/52 (48%) were from influent and 26/52 (50%) from primary effluent. SaV was not detected in samples from the final effluent. Viral load concentration ranged from 3.9×10^4 to 1.9×10^6 gc l⁻¹ and from 5.5×10^4 to 1.6×10^6 gc l⁻¹ in influent and primary effluent respectively. There was no statistical difference in the reduction levels of SaV after the primary treatment ($P = 0.05$, Mann–Whitney *U* test) (Fig. 1). Analysing the period during which wastewater samples were studied, it is possible to observe a higher SaV detection rate during the summer and autumn (23/27 (85.2%)) when compared to winter and spring (2/25 (8%)), $P < 0.001$. Monthly mean

Table 1 Detection, quantification and molecular characterization of sapovirus from stool samples during the studied period (2012–2014)

Year	Origin of patients	Number of positive samples/tested (%)	Quantification range (gc g ⁻¹)	Genotypes	Total number of positive samples/tested (%)
2012	Outpatients	1/42 (2.4)	7.9×10^5	GI.1	2/129 (1.6)
	Inpatients	1/87 (1.2)	1.7×10^5	–	
2013	Outpatients	2/68 (2.9)	2.6×10^8 – 3.2×10^9	GI.1, GI.2	7/136 (5.1)
	Inpatients	5/68 (7.4)	1.0×10^5 – 1.5×10^9	GI.2, GI.6, GI.1	
2014	Outpatients	0/19 (0)	–	–	3/76 (3.9)
	Inpatients	3/57 (5.3)	1.3×10^4 – 8.9×10^6	GV.1	
Total	–	–	–	–	12/341 (3.5)

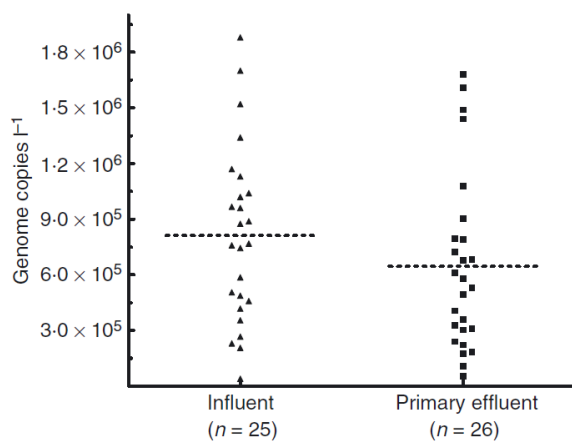


Figure 1 Mean quantity concentration of human sapovirus in influent (untreated wastewater) and primary effluent.

concentration of SaV in influent samples is depicted in Fig. 2.

A total of 17 samples were sequenced (10 from wastewater and 7 from stool samples). The phylogenetic analysis revealed the circulation of five genotypes: GI.1, GI.2, GI.6, GII.1 and GV.1. Strains characterized from wastewater samples were genotyped as GI.1 ($n = 3$) and GI.2 ($n = 7$), while strains obtained from stool samples were genotyped as GI.1 ($n = 2$), GI.2 ($n = 2$), GI.6 ($n = 1$), GII.1 ($n = 1$) and GV.1 ($n = 1$). GI.1 and GI.2 were observed in stool and environmental samples during 2013 and 2014 (Fig. 3). Nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequence identity analyses performed between stool and wastewater samples revealed nt and aa identity varying from 99.7–100 and 100%, respectively, in GI.1

cluster and 96.7–100% (nt) and 96.2–100% (aa) in GI.2 cluster.

Discussion

The improvement of diagnostic molecular assays has demonstrated the importance of human SaV as one of the major causes of nonbacterial AGE cases after norovirus (Tam *et al.* 2012; Bucardo *et al.* 2014). In Brazil, little is known regarding human SaV epidemiology and its impact on public health. This study elucidates the circulation of SaV in one of the most populous states of Brazil, Rio de Janeiro, by demonstrating the presence of those viruses in both stool and wastewater samples.

The detection rate of positive samples for SaV from hospitals (4.2%) was similar to other studies of hospitalized children with AGE in the Philippines (7.0%) (Liu *et al.* 2015) and Thailand (3.4%) (Malasao *et al.* 2008). In Brazil there are few clinical studies that evaluate the circulation of human SaV. Some of these studies have reported these viruses in a day-care centre from asymptomatic children, with 4.6% positivity in Central West of Brazil (Marques Mendanha de Oliveira *et al.* 2014), and 2.5% in diarrheic children from an African-descendant settlement in the North region of Brazil (Aragão *et al.* 2013).

The percentage of positive samples from wastewater (33.0%) was almost ten times higher than observed from stool samples (3.5%). Those results could be associated with a high percentage of asymptomatic AGE cases. Previous studies have already demonstrated subclinical SaV infection (Matson *et al.* 1990; Bucardo *et al.* 2012) and also revealed that asymptomatic individuals shed viruses in the faeces at

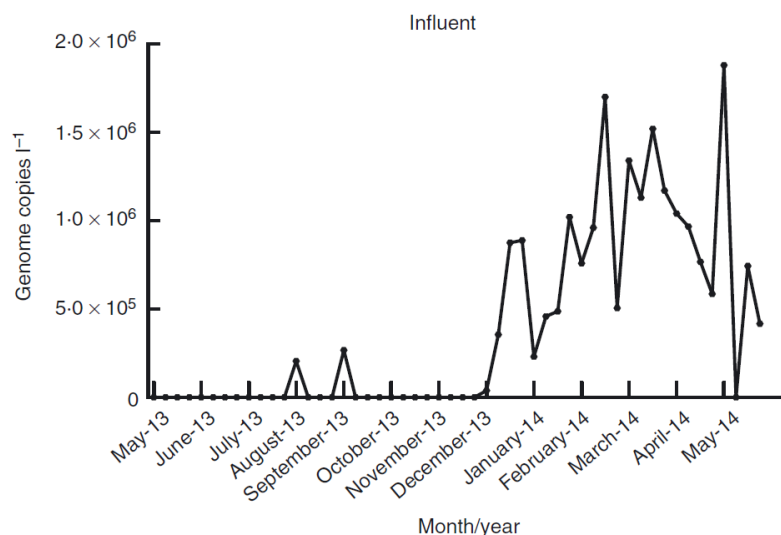


Figure 2 Monthly mean concentration of genome copies per litre of human sapoviruses from untreated wastewater during the period analysed (2013–2014).

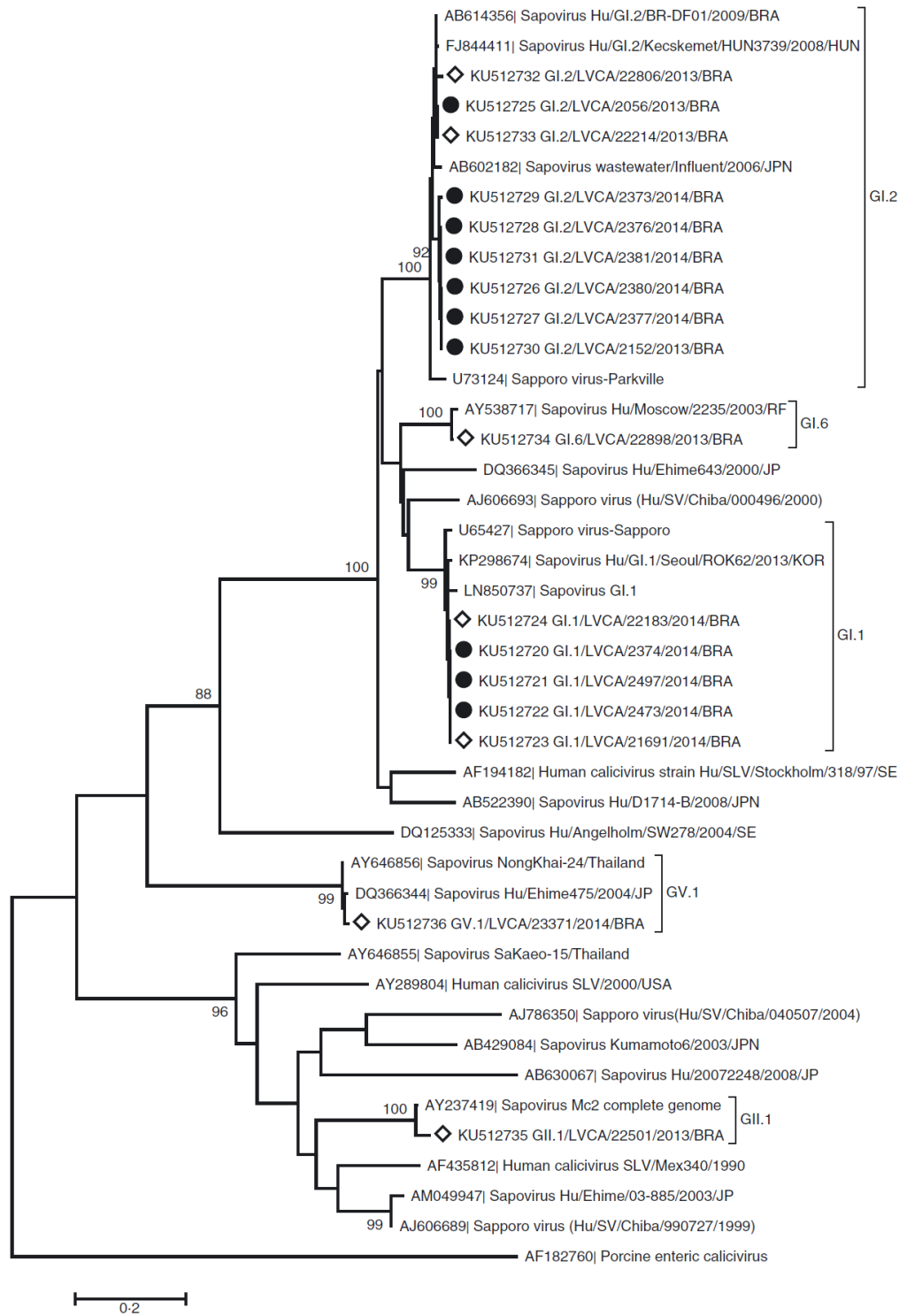


Figure 3 Phylogenetic tree of partial capsid sequencing (400 nt) of sapovirus. Samples obtained from wastewater are marked with black circles, and stool samples are marked with a lozenge.

levels comparable to those shed by individuals with gastroenteritis (Yoshida *et al.* 2009; Kobayashi *et al.* 2012).

The higher rate of SaV from wastewater was observed in rainy seasons (summer and autumn), which is in agreement with a 3-year surveillance study performed in the Central West region of Brazil, which demonstrated a higher proportion of positive results for calicivirus among stool samples collected in the rainy season (Marques Mendanha de Oliveira *et al.* 2014). Due to low positive stool samples (12/341) in our study, we could not infer SaV seasonality in those samples. Further studies are needed to understand the epidemiology of this virus in Brazil in order to determine more clearly. Furthermore, it is important to notice that Brazil exhibits continental dimensions, and the dynamics of the SaV infections may occur differently all over the country. Studies carried out in temperate-zone countries reveal higher viral SaV RNA levels from environmental water samples (i.e. wastewater and river water) in the cold season (Kitajima *et al.* 2010, 2011; Sano *et al.* 2011). However, in a study conducted in United States that assessed two WWTP during 1 year, SaV was detected during all the studied period, with no clear seasonality pattern (Kitajima *et al.* 2014).

The genetic diversity observed in stool samples was higher when compared to wastewater samples. To the best of our knowledge this is the first report of the circulation of GI.6 and GV.1 in Brazil. Those genotypes have been described in an outbreak case that occurred at a primary school in Japan (Usuku and Kumazaki 2014), in hospitalized children in the Philippines (Liu *et al.* 2015) and South Africa (Murray *et al.* 2016). All human SaV detected were from children (≤ 16 years), which corroborates previous clinical studies that demonstrate this virus occur more frequently in early childhood, with a gradually increasing seroprevalence rate with age, reaching a high level (90%) in school-age children and remaining high (80–100%) in adults (Nakata *et al.* 1988, 1998, 2000; Pang *et al.* 2000; de Wit *et al.* 2001; Farkas *et al.* 2006).

On the other hand, the environmental approach detected only the GI.1 and GI.2 genotypes. Interestingly, both genotypes were also detected in stool samples associated with an AGE outbreak that occurred in March 2013. This outbreak was reported by the Secretary of Health in the State (data not shown), but it was not possible to associate SaV as the causative major agent of this outbreak. Nt and aa sequence identity between stool and wastewater samples varied from 96.2 to 100%, which could suggest that viruses detected in wastewater are the same circulating in the population. Several studies demonstrate GI.1 and GI.2 SaV as one of the main genotypes associated with outbreaks and sporadic cases of AGE (Medici *et al.* 2012; Bucardo *et al.* 2014; Iritani *et al.* 2016;

Yoneda *et al.* 2016). The genotypes and viral load concentration detected in wastewater or contaminated sites by the release of untreated sewage, usually demonstrates the flux of the virus in the population and reflects the most prevalent viral infections in the community and the level of water pollution. Nevertheless, the use of direct sequencing of PCR amplicons, employed in the present study, also implies some loss of information on less prevalent genotypes. The environmental approach to assess SaV prevalence in the human population has been conducted in Japan, Spain and Italy using wastewaters and river water samples contaminated with sewage (Hansman *et al.* 2007; Kitajima *et al.* 2010, 2011; Sano *et al.* 2011; Di Bartolo *et al.* 2013). In contrast with our study, a high genetic diversity of human SaV, with a circulation of genogroups I, II, IV and V, was detected in the studies conducted in Japan and Spain (Kitajima *et al.* 2010, 2011; Sano *et al.* 2011), while in Italy, only the genotypes GI.1 and GI.2 were detected (Di Bartolo *et al.* 2013).

Regarding SaV concentration in WWTP, our results demonstrated that the difference in the mean concentration of viral genome load quantified from untreated wastewater and primary effluent were not statistically significant, revealing that the primary treatment is not efficient in removing virus genome from the wastewater. Studies conducted in Japan and United States with wastewater samples detected virus load concentration in influent samples varying from 10^3 to 10^6 gc l^{-1} , which is in agreement with our quantification results (Haramoto *et al.* 2007; Kitajima *et al.* 2014). In these studies, SaV was detected in final effluent, in contrast with our study, where no SaV genome was detected in the final effluent (secondary treatment). Nevertheless, viral genome loads below the qPCR assay detection limit could be present in treated effluent samples. Additionally, the sampling procedure used (grab sample) in this study could not allow the real removal efficiency of the WWTP to be properly inferred. A previous study performed in the same WWTP did not detect the hepatitis A virus genome either in the final effluent (Prado *et al.* 2012), which is in agreement with our results regarding the removal of RNA viruses.

In conclusion, this is the first study in Brazil to assess the circulation of human SaV in both stool and wastewater samples, demonstrating the difference in prevalence of those viruses when using different sampling approaches. Our results emphasize that although present in a low number of AGE cases, there is a genetic diversity of SaV circulating in the city of Rio de Janeiro. On the other hand, this genetic diversity cannot be observed in wastewater samples, which could reflect the occurrence of outbreaks or asymptomatic infections, mainly due to the high prevalence observed from those samples.

Acknowledgements

We are most grateful to Tatsuya Nagata from the Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, DF, Brazil for the kind provision of plasmids that contained the SaV genome. The project was financially supported by Faperj (E-26/102.845/2012) and CNPq. This research study is under the scope of the activities of Fiocruz as a Collaborating Center of PAHO/WHO of Public and Environmental Health.

Conflict of Interest

No conflict of interest declared.

References

- Aragão, G.C., Mascarenhas, J.D., Kaiano, J.H., de Lucena, M.S., Siqueira, J.A., Fumian, T.M., Hernandez, J.d., de Oliveira, C.S. *et al.* (2013) Norovirus diversity in diarrheic children from an African-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. *PLoS ONE* **8**, e56608.
- Bucardo, F., Carlsson, B., Nordgren, J., Larson, G., Blandon, P., Vilchez, S. and Svensson, L. (2012) Susceptibility of children to sapovirus infections, Nicaragua, 2005–2006. *Emerg Infect Dis* **18**, 1875–1878.
- Bucardo, F., Reyes, Y., Svensson, L. and Nordgren, J. (2014) Predominance of norovirus and sapovirus in Nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination. *PLoS ONE* **9**, e98201.
- Calgua, B., Rodriguez-Manzano, J., Hundesa, A., Suñen, E., Calvo, M., Bofill-Mas, S. and Girones, R. (2013) New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J Virol Methods* **187**, 215–221.
- Chiba, S., Sakuma, Y., Kogasaka, R., Akihara, M., Horino, K., Nakao, T. and Fukui, S. (1979) An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol* **4**, 249–254.
- Di Bartolo, I., Ponterio, E., Battistone, A., Bonomo, P., Cicala, A., Mercurio, P., Triassi, M., Pennino, F. *et al.* (2013) Identification and genotyping of human sapoviruses collected from sewage water in Naples and Palermo, Italy, in 2011. *Food Environ Virol* **5**, 236–240.
- Farkas, T., Deng, X., Ruiz-Palacios, G., Morrow, A. and Jiang, X. (2006) Development of an enzyme immunoassay for detection of sapovirus-specific antibodies and its application in a study of seroprevalence in children. *J Clin Microbiol* **44**, 3674–3679.
- Green, K. (2013) Caliciviridae: the noroviruses. In *Fields Virology* ed. Knipe, D.M., Howley, P.M. *et al.* pp. 582–608. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**, 95–98.
- Hansman, G.S., Sano, D., Ueki, Y., Imai, T., Oka, T., Katayama, K., Takeda, N. and Omura, T. (2007) Sapovirus in water, Japan. *Emerg Infect Dis* **13**, 133–135.
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K. and Ohgaki, S. (2007) Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *J Appl Microbiol* **103**, 2153–2159.
- IBGE – The Brazilian Institute of Geography and Statistics (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2007). <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007>. Accessed 08 December 2015.
- IBGE – The Brazilian Institute of Geography and Statistics (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2014). http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/pdf/analise_estimativas_2014.pdf. Accessed 08 December 2015.
- Iizuka, S., Takai-Todaka, R., Ohshiro, H., Kitajima, M., Wang, Q., Saif, L.J., Wakita, T., Noda, M. *et al.* (2013) Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams. *Food Environ Virol* **5**, 119–125.
- Iritani, N., Yamamoto, S.P., Abe, N., Kubo, H., Oka, T. and Kaida, A. (2016) Epidemics of GI.2 sapovirus in gastroenteritis outbreaks during 2012–2013 in Osaka City, Japan. *J Med Virol* **88**, 1187–1193.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111–120.
- Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Katayama, H., Takeda, N., Katayama, K. and Ohgaki, S. (2010) Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. *Appl Environ Microbiol* **76**, 2461–2467.
- Kitajima, M., Haramoto, E., Phanuwat, C. and Katayama, H. (2011) Genotype distribution of human sapoviruses in wastewater in Japan. *Appl Environ Microbiol* **77**, 4226–4229.
- Kitajima, M., Iker, B.C., Pepper, I.L. and Gerba, C.P. (2014) Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes - identification of potential viral indicators. *Sci Total Environ* **1**, 488–489.
- Kobayashi, S., Fujiwara, N., Yasui, Y., Yamashita, T., Hiramatsu, R. and Minagawa, H. (2012) A foodborne outbreak of sapovirus linked to catered box lunches in Japan. *Arch Virol* **157**, 1995–1997.
- Lee, L.E., Cebelinski, E.A., Fuller, C., Keene, W.E., Smith, K., Vinje, J. and Besser, J.M. (2012) Sapovirus outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002–2009. *Emerg Infect Dis* **18**, 873–876.
- Liu, X., Yamamoto, D., Saito, M., Imagawa, T., Ablola, A., Tandoc, A.O. 3rd, Segubre-Mercado, E., Lupisan, S.P. *et al.* (2015) Molecular detection and characterization of sapovirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in the Philippines. *J Clin Virol* **68**, 83–88.
- Malasao, R., Maneekarn, N., Khamrin, P., Pantip, C., Tonusin, S., Ushijima, H. and Peerakome, S. (2008) Genetic diversity of norovirus, sapovirus, and astrovirus isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol* **80**, 1749–1755.

- Marques Mendanha de Oliveira, D., Souza, M., Souza Fiaccadori, F., César Pereira Santos, H. and das Dôres de Paula Cardoso, D. (2014) Monitoring of Calicivirus among day-care children: evidence of asymptomatic viral excretion and first report of GI.7 Norovirus and GI.3 Sapovirus in Brazil. *J Med Virol* **86**, 1569–1575.
- Matson, D.O., Estes, M.K., Tanaka, T., Bartlett, A.V. and Pickering, L.K. (1990) Asymptomatic human calicivirus infection in a day care center. *Pediatr Infect Dis J* **9**, 190–196.
- Medici, M.C., Tummolo, F., Albonetti, V., Abelli, L.A., Chezzi, C. and Calderaro, A. (2012) Molecular detection and epidemiology of astrovirus, bocavirus, and sapovirus in Italian children admitted to hospital with acute gastroenteritis, 2008–2009. *J Med Virol* **84**, 643–650.
- Murray, T.Y., Nadan, S., Page, N.A. and Taylor, M.B. (2016) Diverse sapovirus genotypes identified in children hospitalised with gastroenteritis in selected regions of South Africa. *J Clin Virol* **76**, 24–29.
- Nakata, S., Estes, M.K. and Chiba, S. (1988) Detection of human calicivirus antigen and antibody by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* **26**, 2001–2005.
- Nakata, S., Honma, S., Numata, K., Kogawa, K., Ukae, S., Adachi, N., Jiang, X., Estes, M.K. et al. (1998) Prevalence of human calicivirus infections in Kenya as determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J Clin Microbiol* **36**, 3160–3163.
- Nakata, S., Honma, S., Numata, K.K., Kogawa, K., Ukae, S., Morita, Y., Adachi, N. and Chiba, S. (2000) Members of the family Caliciviridae (Norwalk virus and Sapporo virus) are the most prevalent cause of gastroenteritis outbreaks among infants in Japan. *J Infect Dis* **181**, 2029–2032.
- Oka, T., Katayama, K., Hansman, G.S., Kageyama, T., Ogawa, S., Wu, F.T., White, P.A. and Takeda, N. (2006) Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* **78**, 1347–1353.
- Oka, T., Mori, K., Iritani, N., Harada, S., Ueki, Y., Iizuka, S. and Mise, K. (2012) Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol* **157**, 349–352.
- Page, N., Groome, M.J., Murray, T., Nadan, S., Netshikweta, R., Keddy, K.H., Poonsamy, B., Moyes, J. et al. (2016) Sapovirus prevalence in children less than five years of age hospitalised for diarrhoeal disease in South Africa, 2009–2013. *J Clin Virol* **19**, 82–88.
- Pang, X.L., Honda, S., Nakata, S. and Vesikari, T. (2000) Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis* **181**, 288–294.
- Prado, T., Fumian, T.M., Miagostovich, M.P. and Gaspar, A.M. (2012) Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **106**, 104–109.
- Rajal, V.B., McSwain, B.S., Thompson, D.E., Leutenegger, C.M., Kildare, B.J. and Wuertz, S. (2007) Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res* **41**, 1411–1422.
- Sano, D., Pérez-Sautu, U., Guix, S., Pintó, R.M., Miura, T., Okabe, S. and Bosch, A. (2011) Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain. *Appl Environ Microbiol* **77**, 1111–1114.
- Scheuer, K.A., Oka, T., Hoet, A.E., Gebreyes, W.A., Molla, B.Z., Saif, L.J. and Wang, Q. (2013) Prevalence of porcine noroviruses, molecular characterization of emerging porcine sapoviruses from finisher swine in the United States, and unified classification scheme for sapoviruses. *J Clin Microbiol* **51**, 2344–2353.
- Svraka, S., Vennema, H., van der Veer, B., Hedlund, K.O., Thorhagen, M., Siebenga, J., Duizer, E. and Koopmans, M. (2010) Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe. *J Clin Microbiol* **48**, 2191–2198.
- Tam, C.C., O'Brien, S.J., Tompkins, D.S., Bolton, F.J., Berry, L., Dodds, J., Choudhury, D., Halstead, F. et al. (2012) IID2 Study Executive Committee. Changes in causes of acute gastroenteritis in the United Kingdom over 15 years: microbiologic findings from 2 prospective, population-based studies of infectious intestinal disease. *Clin Infect Dis* **54**, 1275–1286.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725–2729.
- Usuku, S. and Kumazaki, M. (2014) A gastroenteritis outbreak attributed to sapovirus genogroup V in Yokohama, Japan. *Jpn J Infect Dis* **67**, 411–412.
- de Wit, M.A., Koopmans, M.P., Kortbeek, L.M., Wannet, W.J., Vinje, J., van Leusden, F., Bartelds, A.I. and van Duynhoven, Y.T. (2001) Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol* **154**, 666–674.
- Xavier, M.P., Oliveira, S.A., Ferreira, M.S., Victoria, M., Miranda, V., Silva, M.F., Strina, A., Barreto, M.L. et al. (2009) Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res* **42**, 438–444.
- Yoneda, M., Nakano, M., Sugimoto, D., Inada, M., Fujitani, M. and Kitahori, Y. (2016) Epidemiological characteristics of sapovirus and human astrovirus detected among children in the Nara Prefecture, Japan, during 2009/2010–2014/2015 Seasons. *Jpn J Infect Dis* doi:10.7883/joken.JJID.2015.529 (in press).
- Yoshida, T., Kasuo, S., Azegami, Y., Uchiyama, Y., Satsumabayashi, K., Shiraishi, T., Katayama, K., Wakita, T. et al. (2009) Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. *J Clin Virol* **45**, 67–71.

5 DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da dinâmica temporal das variantes de NoV GII.4

5.1.1 Artigo 1: Temporal Dynamics of Norovirus GII.4 Variants in Brazil between 2004 and 2012

O NoV GII.4, descrito como o genótipo mais prevalente em surtos de GA desde meados da década de 1990 (Noel et al., 1999; Lopman et al., 2004; Lindesmith et al., 2008), evolui em um ciclo com novas variantes emergindo em um período de 2 a 4 anos, substituindo variantes dominantes anteriores, em um processo conduzido pela evasão da imunidade na população humana (Lopman et al., 2004; Hasing et al., 2013; Fonager et al., 2013). A evolução do GII.4 e o surgimento de novas variantes epidêmicas são impulsionados, principalmente, por mutações no subdomínio P2, localizado na ORF2, descrito como uma região hipervariável do capsídeo, sendo responsável pela interação com os receptores das células hospedeiras (Tan et al., 2003; Chen et al., 2004; Lindesmith et al., 2008; Bull et al., 2010; Boon et al., 2011). Mutações no subdomínio P2 podem levar a mudanças significativas nos epítomos-chaves, resultando na capacidade do vírus de escapar de anticorpos gerados por exposição prévia a estirpes geneticamente relacionadas a NoV GII.4 (Bull & White 2011). Este processo é conhecido como evolução temporal, sendo descrito pela primeira vez para o vírus influenza para explicar o aparecimento de estirpes epidêmicas.

Neste estudo, 147 amostras de NoV GII.4 previamente genotipadas pela região D (253 pb) (Vinjé et al., 2004) foram submetidas a um novo sequenciamento nucleotídico da região que codifica o subdomínio P2 (630 pb) (Vega et al., 2011), permitindo, portanto, uma análise filogenética mais fidedigna em comparação com a outra região sequenciada (região D). A análise temporal destas amostras obtidas de casos de GA ocorridos em diferentes regiões do país em um intervalo de nove anos (2004 – 2012) demonstrou a circulação de seis variantes GII.4 no período [Asia_2003 (2002), Hunter_2004 (2003), Yerseke_2006a (2005), Den Haag_2006b (2005), Nova Orleans_2009 (2008), e Sydney_2012 (2011)], com um padrão claro de emergência e substituição destas ao longo dos anos. A primeira variante a ser detectada foi a Asia_2003, que predominou no ano de 2004, sendo posteriormente substituída pela Hunter_2004 no ano de 2005. No ano seguinte, a variante Den Haag_2006b emergiu,

substituindo a anterior, e se mantendo prevalente durante os dois anos seguintes (2007 e 2008). Diversos estudos demonstram que a emergência da variante Den Haag_2006b resultou em um aumento significativo de casos de surtos de GA mundialmente (CDC, 2007; Kroneman et al., 2008; Siebenga et al., 2008; Lindesmith et al., 2011). No nosso estudo, foi demonstrado sua co-circulação com outras durante os anos de 2007 – 2011.

A árvore filogenética de máxima verossimilhança evidenciou a separação da variante Den Haag_2006b em dois subclados, sugerindo uma diferença temporal entre essas amostras. A análise bayesiana destas amostras demonstrou a circulação de uma sublinhagem desta variante durante os anos de 2006 a 2008, e posteriormente uma outra sublinhagem que evoluiu a partir da primeira, circulando entre os anos de 2009 – 2011. Paralelamente, dados da literatura demonstraram a emergência em 2006 de outra variante, denominada Yerseke_2006a. No presente estudo a Yerseke_2006a circulou durante os anos de 2007 – 2010. Na Europa, estudos evidenciaram que estas duas variantes (Yerseke_2006a e Den_Haag_2006b) foram encontradas em proporções equivalentes durante o inverno de 2006/2007. No verão/outono de 2007 a variante Den Haag_2006b se tornou dominante em relação à Yerseke_2006a e muitos países relataram um aumento de surtos em outubro e novembro daquele ano. Na Holanda, a variante Den Haag_2006b foi responsável por 46 – 73% dos surtos por NoV GII.4, enquanto a Yerseke_2006a por 10 – 11,5% em outubro e novembro de 2007. No ano de 2008, as duas variantes co-circulavam, entretanto, a variante Den Haag_2006b parecia ser mais prevalente na grande maioria dos países europeus (Siebenga et al., 2008). Esse evento foi similar ao ocorrido no Japão e Austrália, onde a Yerseke_2006a, predominante nos anos 2005/2006, foi substituída pela Den Haag_2006b no período de 2006/2007, se tornando dominante (Tu et al., 2008; Motomura et al., 2010; Eden et al., 2010).

Em 2009, a emergência da variante New Orleans_2009 no Brasil, não substituiu as circulantes anteriores, se tornando predominante apenas a partir de 2010. Nos EUA, a emergência desta variante substituiu a Den Haag_2006b (Vega et al., 2011, Yen et al., 2011), sendo responsável por 60% dos surtos de NoV durante 2009/2010.

Em 2012 foi observada a emergência e substituição da variante anterior pela Sidney_2012. Esta variante, relacionada com a New Orleans_2009, foi descrita circulando em países como a França, Austrália, Inglaterra, Nova Zelândia e Japão,

onde foi observado o aumento de surtos e casos esporádicos desde novembro de 2012 (Bennett et al., 2013; van Beek et al., 2013).

A taxa média estimada de evolução do subdomínio P2 (7.3×10^{-3} subst./sítio/ano) foi semelhante às taxas relatadas em estudos anteriores que avaliaram todo o gene que codifica para VP1 ($1.9 - 9.0 \times 10^{-3}$ subst./sítio/ano) (Bok et al., 2009; Bull et al., 2010; Siebenga et al., 2010; Boon et al., 2011). As datas do ancestral mais recente comum (T_{MRCA}) das seis variantes detectadas demonstra que o processo de diversificação começa pelo menos um ano antes da variante tornar-se uma estirpe dominante e causar epidemias. Estudos têm proposto que uma estirpe circula em níveis baixos, acumulando mutações durante algum tempo antes de se tornar pandêmica (Eden et al., 2010).

A reconstrução da história demográfica do clado Den Haag_2006b demonstra que, depois de um rápido aumento em 2005, a população atingiu um tamanho máximo efetivo no início de 2006 (quando esta variante foi detectada pela primeira vez) e então decaiu até meados de 2008. A partir de então, esta variante atingiu um novo tamanho máximo efetivo da população em 2009. A avaliação da dinâmica temporal desta variante na Argentina demonstrou que o tamanho efetivo da população aumentou em meados de 2004 e começou a diminuir em 2008 (Fernández et al., 2012). Tais padrões demográficos complexos desta variante podem ser relacionados com a existência de duas sublinhagens distintas da Den Haag_2006b no Brasil: a sublinhagem “Y” (*younger*), que surgiu por volta de 2008, é um ancestral da sublinhagem “O” (*older*) que surgiu provavelmente em 2005. O aparecimento da sublinhagem “Y” coincide com a segunda fase de expansão da Den Haag_2006b. A identificação de algumas amostras de Taiwan, Suécia e Japão, que agruparam no mesmo clado da sublinhagem “Y” sugere que esta não é exclusiva do Brasil. É interessante notar que os vírus da sublinhagem “Y” apresentaram um grande número de substituições nos resíduos 255, 357, 368 e 425 em relação ao subgrupo “O” (dados não mostrados). O resíduo 368 está localizado no epítipo putativo “A” do capsídeo viral, que é associado como o mais provável responsável pela diferença na antigenicidade de variantes GII.4 (Debbink et al., 2012; Lindesmith et al., 2012), sugerindo que as sublinhagens “O” e “Y” da variante Den Haag_2006b pode representar duas variantes antigênicas distintas de NoV GII.4.

Até o ano de 2016, nenhuma outra variante GII.4 foi descrita após a emergência da Sydney_2012. Atualmente dados têm demonstrado um aumento significativo na

prevalência do genótipo GII.17, sendo este associado a inúmeros surtos de GA, com prevalência inclusive maior que a do GII.4 (Gao et al., 2015). Caso esse padrão se confirme, é possível que o GII.17 se torne o principal genótipo associado aos surtos de GA. Desta maneira, se ratifica a importância da vigilância epidemiológica, assim como a caracterização molecular dos NoV a fim de se estimar e compreender qual impacto que essas mudanças de emergência e substituição de genótipos e/ou variantes tem na saúde da população.

5.2 Detecção de Calicivírus humanos em amostras clínicas e em águas residuárias

Este estudo envolveu a investigação laboratorial de CaV humanos em amostras clínicas e ambientais com o objetivo de se avaliar o impacto dos NoV GIV e dos SaV em casos de GA no Rio de Janeiro.

Com este propósito, foram analisadas amostras clínicas provenientes de atendimentos hospitalares e ambulatoriais, cujas amostras coletadas pelo Laboratório Central do Estado foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental para definição de agente etiológico viral. Para o monitoramento ambiental foram realizadas coletas semanais na estação de tratamento de esgoto (ETE) Alegria, escolhida por atender aproximadamente 1,5 milhão de habitantes do centro e bairros da zona norte do Rio de Janeiro. A ETE realiza tratamento secundário aplicando o tratamento aeróbico de lodo ativado sem posterior cloração do efluente. Ao final de todo o tratamento, o efluente é descartado na Baía de Guanabara, perfazendo seu papel no programa de despoluição da Baía de Guanabara.

5.2.1 Artigo 2: Surveillance of Noroviruses in Rio de Janeiro: Occurrence of genogroup IV in clinical and wastewater samples

O principal objetivo deste estudo foi investigar o impacto dos NoV GIV em casos de GA no Estado, uma vez que o diagnóstico das infecções por NoV, assim como os estudos que avaliaram a disseminação destes vírus em amostras ambientais foram restritos a pesquisa dos NoV GI e GII (Victoria et al., 2007; 2010; 2014a; Ferreira et

al., 2008; 2010a; 2012; Fioretti et al., 2011; Vieira et al., 2012; Fumian et al., 2013; 2016). Em relação as amostras de águas residuárias, os nossos resultados demonstraram que taxa de positividade de GII no afluente (96,2%) foi significativamente maior quando comparado às taxas de GI e GIV (38,5% e 52%, respectivamente). Em um estudo anterior realizado nos anos de 2009 e 2010 nesta mesma ETE, Fumian e colaboradores (2013) detectaram GII em 55% das amostras de esgoto bruto, entretanto não observaram a presença de GI nestas amostras. Esta discrepância pode ser devido à diferença das metodologias de concentração empregadas nestes dois estudos, uma sendo empregada a metodologia de floculação por leite (presente estudo) e outra utilizando o método de ultracentrifugação (Fumian et al., 2013). Recentemente, Victoria e colaboradores (2016) observaram taxas de frequências variando entre 17 – 42% para GI e 46 – 100% para GII em amostras de esgoto bruto provenientes de diferentes regiões do Uruguai. No Japão, GI e GII foram detectados em todas as amostras de esgoto bruto durante os períodos de 2003/2004 e 2005/2006 (Haramoto et al., 2006; Kitajima et al., 2012). Em relação ao GIV em águas residuárias não tratadas, estudos demonstram taxa de positividade variando de 16,7% no Brasil (região Norte) (Teixeira et al., 2016), 21,8% em Itália (Muscillo et al., 2013), 50% no Japão (Kitajima et al., 2009) e 67% nos EUA (Kitajima et al., 2014).

A quantificação das amostras de esgoto bruto variou de $10^4 - 10^7$ cg l⁻¹ para GII e $10^4 - 10^6$ cg l⁻¹ para GI e GIV. Estes resultados são semelhantes aos dados observados na Suécia e Uruguai, onde a concentração de GI e GII no esgoto bruto variou $10^3 - 10^7$ cg l⁻¹ (Nordgren et al., 2009; Victoria et al., 2014b). A média das concentrações de GII nas amostras de esgoto bruto foi significativamente maior em relação às médias de GI e GIV. Sabe-se que o NoV GII é mais prevalente em relação ao GI em amostras ambientais e em surtos e casos esporádicos de GA (Lodder e de Roda Husman, 2005; Haramoto et al., 2006; Katayama et al., 2008; Bucardo et al., 2008; Kroneman et al., 2008).

A análise das frequências de NoV mensais no esgoto bruto demonstrou o GII presente durante todo o período estudado (maio / 2013 a maio / 2014), enquanto o GI e GIV apresentaram picos de incidência variadas. As cargas virais dos três genogrupos variaram ao longo do período analisado, no entanto, não foi possível inferir uma correlação entre as estações. Estes resultados estão de acordo com um estudo que avaliou as cargas virais NoV em duas ETEs, durante um ano nos EUA, onde a concentração destes três genogrupos variou ao longo do período estudado,

mas não foram maiores durante os meses mais frios (Kitajima et al., 2014). Em contraste com o nosso estudo, Victoria e colaboradores (2010), observaram maior concentração de NoV nos meses mais frios durante 2005, em águas residuárias coletadas da ETE da Fiocruz. Outros estudos realizados em países de clima temperado, também demonstram maior concentração de NoV em amostras coletadas durante os meses de inverno (Haramoto et al, 2006; Kitajima et al, 2009, 2012; Katayama et al, 2008; Pérez-Sautu et al., 2012).

Ao comparar a frequência e quantificação de todos os genogrupos entre amostras de afluente e de efluente primário, não foi observada uma redução significativa na taxa de frequência e na concentração viral. No entanto, nas amostras provenientes do efluente secundário, foi observada uma redução na frequência de NoV (1,9% para o GI e GIV e 5,8% para GII). Fumian e colaboradores (2013) também demonstraram uma redução na frequência de GII, 55% para 8% em esgoto e águas residuárias tratadas, respectivamente, nesta mesma ETE. Por outro lado, estudos realizados no Japão, Itália e Tunísia relataram taxas de positividade mais elevadas, variando de 47,9 a 100% em esgoto tratado (Haramoto et al, 2006; La Rosa et al, 2010; Hassine-Zafrane et al, 2014). Tendo em conta a ausência de dados de infecciosidade de NoV detectados em águas residuárias tratadas, a importância para a saúde pública deste achado é incerta.

Em relação às amostras clínicas coletadas no estado do Rio de Janeiro, NoV foi detectado em 27,5% dos casos durante os três anos estudados. Observou-se uma variação da taxa de positividade, sendo 32,7%, 18,5% e 34,4% nos anos de 2012, 2013 e 2014, respectivamente. Analisando a dinâmica temporal de NoV ao longo dos três anos estudados, foi possível observar uma maior incidência de NoV nos meses mais frios de 2012, 2013 e 2014, mas também, nos verões de 2013 e 2014. Recentemente, Fumian e colaboradores (2016) observaram uma variação na taxa de detecção de NoV, sendo 33% dos casos estudados durante o período de outubro/2013 – fevereiro/2014 e 13,8% em setembro – dezembro/2014, em amostras clínicas coletadas de diferentes estados do Brasil. Neste estudo, foi observado um aumento da incidência de NoV durante o verão. Por outro lado, um estudo de vigilância de NoV durante oito anos no Sul do Brasil demonstrou sazonalidade, com maior incidência de casos positivos durante o período de inverno/primavera (de Andrade et al., 2014), enquanto que na região Centro-Oeste, Borges e colaboradores (2006) observaram maior incidência NoV no período chuvoso (setembro a março). Esta

discrepância observada em resultados de estudos provenientes da mesma área geográfica demonstra que, em países de clima tropical é difícil o estabelecimento de um padrão de sazonalidade definido, principalmente no Brasil, que apresenta dimensões continentais, onde o clima pode variar dependendo da região analisada.

As cargas virais de NoV em amostras clínicas variaram de 10^3 a 10^{12} CG g⁻¹. Estudos epidemiológicos que comparam a quantificação NoV em amostras de fezes não demonstram uma correlação positiva com a gravidade da doença (Barreira et al., 2010; González et al., 2011).

Dentre as três amostras clínicas detectadas para GIV, duas apresentaram co-infecção com o GI e GI/GII. Assim, não foi possível inferir se o caso de GA poderia estar associada à infecção GIV nos pacientes afetados. Em Bangladesh, pacientes com doença diarreica, apresentaram co-infecção com os três genogrupos (GI, GII e GIV) em 11% dos casos positivos para NoV e 2% apresentavam infecção com apenas GIV (Rahman et al., 2016). Correlacionando com os nossos resultados de águas residuárias, foi observada uma porcentagem de positividade maior (34%) no esgoto bruto, quando comparado com as amostras clínicas (0,9%). Um resultado semelhante foi observado na Itália, onde a positividade para o GIV em amostras de esgoto bruto (21,8%) foi maior quando comparada com os casos de diarreia coletadas de pacientes internados (3,2%) (Muscillo et al., 2013). Estes resultados sugerem a associação da infecção por NoV GIV com casos assintomáticos. No entanto, é importante notar que a GA não é uma doença grave em adultos, muitos casos não são notificados, o que também pode explicar a elevada prevalência em águas residuárias não tratadas, mas não em amostras clínicas.

5.2.2 Artigo 3: Occurrence of human sapoviruses in wastewater and stool samples in Rio De Janeiro, Brazil

No Brasil, o diagnóstico de SaV não está incluído em programas de vigilância de surtos e casos esporádicos de GA, sendo os dados epidemiológicos restritos a estudos clínicos retrospectivos (Borges et al., 2006; Xavier et al., 2009; dos Anjos et al., 2011; Aragão et al., 2010; 2013; Marques Mendanha de Oliveira et al., 2014; Portal et al., 2016). Estes estudos avaliaram a presença de SaV em amostras clínicas nas

regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, evidenciando a falta de informações a respeito da circulação destes vírus nas regiões Sul e Sudeste do país. Em relação aos SaV, também é relevante a ausência de estudos que investigam sua disseminação ambiental. Deste modo, este estudo descreve pela primeira vez a detecção de SaV em casos de GA aguda ocorridos na região Sudeste, assim como os níveis de concentração destes vírus em águas residuárias da região metropolitana do estado do Rio de Janeiro. Para esta investigação, estabeleceu-se a metodologia de multiplex qPCR, o qual detecta os quatro genogrupos humanos de SaV em uma única reação, utilizando iniciadores que amplificam a região mais conservada do genoma (junção da polimerase e gene da VP1) (Oka et al., 2006). Para genotipagem das amostras positivas, foi utilizado um protocolo de PCR qualitativa a qual amplifica uma região do capsídeo viral (VP1) (Kitajima et al., 2010a).

O percentual de 3,5% de positividade encontrado é compatível com dados obtidos no estado do Pará que demonstraram esses vírus em 2,5% dos casos de GA em uma comunidade Quilombola (Aragão et al., 2013) e em 4,9% em crianças menores de 3 anos (Aragão et al., 2010). Em outro estudo conduzido em uma creche em Goiás, os SaV foram detectados em 4,6% das amostras testadas, e surpreendentemente a maioria dos casos positivos foram provenientes de crianças assintomáticas (Marques Mendanha de Oliveira et al., 2014).

A quantificação da carga viral nestas amostras variou de 10^4 a 10^9 de cópias de genoma (CG)/g. Não foi observada significância estatística na frequência e na carga viral dos pacientes hospitalizados ou atendidos em unidades ambulatoriais. As amostras estudadas foram provenientes de pacientes de todas faixas etárias (menores de 1 ano até 84 anos), sendo todas as amostras positivas de pessoas menores de 16 anos. Esses dados corroboram com estudos clínicos que demonstram que este vírus ocorre frequentemente na infância, com uma taxa de soroprevalência aumentando com a idade, atingindo um nível elevado (90%) em crianças em idade escolar e permanecendo alto em adultos (80 – 100%) (Nakata et al., 1988; 1998; 2000; Pang et al., 2000; de Wit et al., 2001; Farkas et al., 2006).

Em relação à vigilância epidemiológica dos SaV em amostras residuárias, foi evidenciado taxas de positividade de 48% (25/52) e 50% (26/52) nas amostras de esgoto bruto e de tratamento primário, respectivamente. Estudos realizados no Japão (Kitajima et al., 2010a) e na Itália (Di Bartolo et al., 2013) com amostras de esgoto

bruto demonstraram taxa de positividade para SaV em 100% e 12.4%, respectivamente.

Pode-se observar uma grande diferença nas frequências de SaV nas amostras clínicas (3,5%) e de esgoto bruto (48%). Estes dados sugerem que o SaV pode estar associado a uma elevada percentagem de casos assintomáticos. Estudos anteriores já demonstraram infecção subclínica por SaV (Matson et al., 1990; Bucardo et al., 2012), assim como a liberação destes vírus em indivíduos assintomáticos em níveis comparáveis ao liberado por indivíduos com GA (Yoshida et al., 2009; Kobayashi et al., 2012).

A concentração de vírus nas amostras residuárias variou de 10^4 a 10^6 CG/l no esgoto bruto e efluente primário, não sendo observada diferença estatisticamente significativa na diminuição da concentração da carga viral nestes dois tipos de amostra. Esse resultado demonstra que o tratamento primário não é eficiente na remoção e/ou diminuição da carga viral a partir do esgoto bruto. Em contrapartida, os SaV não foram observados no efluente secundário, que pode ser o resultado de concentrações de SaV abaixo do limite de detecção do método de quantificação utilizado. Concentrações elevadas de SaV (até 10^8 CG/l) foram detectadas em esgoto bruto proveniente de uma ETE na Espanha (Sano et al., 2011), e, após o tratamento secundário foi observado uma redução média logarítmica de 2,9 no número de cópias de SaV por litro, indicando que os processos de tratamento convencional de águas residuárias empregado pode reduzir os níveis SaV por quase 3 logs.

O sequenciamento parcial da região que codifica para o capsídeo viral demonstrou a circulação dos genótipos GI.1, GI.2, GI.6, GII.1 e GV.1 em amostras clínicas e GI.1 e GI.2 em amostras ambientais. Esta é a primeira descrição da circulação dos GI.6 e GV.1 no Brasil. Foi observada uma maior diversidade genética em amostras clínicas (cinco genótipos descritos) em relação às amostras de esgoto (dois genótipos). Em contraste com o nosso estudo, uma alta diversidade genética da SaV humanos, com circulação dos genogrupos I, II, IV e V em amostras de esgoto, foi detectada nos estudos realizados no Japão e Espanha (Kitajima et al., 2010a; 2011; Sano et al., 2011), enquanto que na Itália, apenas os genótipos GI.1 e GI.2 foram detectados (Di Bartolo et al., 2013). Um dos fatores que podem ter contribuído para essa diferença foi a metodologia utilizada. O sequenciamento direto do produto de PCR implica em perda de informações em relação aos genótipos menos prevalentes, sendo preconizada a clonagem desses produtos quando são utilizadas amostras

ambientais. Também é importante levar em consideração que apenas 10, das 51 amostras de esgoto positivas, foram obtidas sequências nucleotídicas de qualidade adequada para a análise filogenética, enquanto que para as amostras clínicas, das 12 positivas para SaV, sete foram sequenciadas. Tanto as amostras clínicas como as de esgoto caracterizadas como GI.1 agruparam em um mesmo clado na árvore filogenética, sendo o mesmo ocorrido para o genótipo GI.2. A análise de identidade nucleotídica e aminoacídica entre essas amostras revelou em algumas delas, 100% de identidade nucleotídica entre as amostras de esgoto e clínica corroborando a prerrogativa de que os vírus encontrados no esgoto refletem a epidemiologia em humanos (Bosch et al., 2008).

Durante os três anos de estudo, não foi possível observar um padrão de sazonalidade na frequência dos SaV em amostras clínicas, uma vez que o número de amostras positivas (12/341) foi muito baixo para ser realizada essa inferência. Entretanto, foi observada maior frequência e carga viral destes vírus em amostras residuárias durante os meses mais chuvosos do ano (Dezembro/2013 a Abril/2014). Um estudo conduzido na região Centro-Oeste evidenciou este mesmo padrão de sazonalidade dos SaV em amostras clínicas (Marques Mendanha de Oliveira et al., 2014). Em países de clima temperado, os SaV são detectados com maior frequência e carga viral nos meses mais frios do ano em águas residuárias (Kitajima et al., 2010a; 2011; Sano et al., 2011). Dados divergentes a respeito do padrão de sazonalidade de vírus gastroentéricos também são relatados no Brasil (Borges et al., 2006; Morillo et al., 2011b; Siqueira et al., 2011; de Andrade et al. 2014; Fumian et al., 2016).

5.3 Comentários finais

Os resultados obtidos nesta tese contribuem para a ampliação dos dados de circulação, frequência e diversidade genética dos CaV humanos, ressaltando a necessidade de se estabelecer uma rede de diagnóstico laboratorial que realize a vigilância ativa destes vírus no país. A importância de se monitorar a introdução de novas variantes de NoV, principalmente quando se espera a médio prazo a disponibilidade no mercado de uma vacina anti NoV é evidente. Também é de grande relevância a determinação do impacto dos diferentes genótipos dentro dos gêneros estudados, principalmente devido à capacidade evolutiva dos membros desta família viral.

6 CONCLUSÕES

- Seis variantes de NoV GII.4 circularam no país no período de 2004 – 2012.
- A variante Den Haag_2006b circulou por seis anos no país, exibindo duas sublinhagens temporalmente e filogeneticamente distintas.
- O padrão de temporalidade de emergência e substituição das variantes de NoV GII.4 durante os anos estudados foi semelhante ao descrito em outros estudos.
- No estado do Rio de Janeiro os NoV GI, II e IV foram associados a 27% dos casos de GA entre os anos 2012 – 2014.
- Não foi observado padrão de sazonalidade de NoV GII em amostras de esgoto.
- A alta taxa de detecção de NoV GI (38.5%) e GIV (52%) em amostras de esgoto bruto quando comparada à baixa detecção em amostras clínicas, sugere infecção assintomática destes vírus.
- A alta concentração de vírus presentes em esgoto bruto revela o potencial risco a população humana que está em contato direto com esgoto não tratado.
- A diminuição da detecção e da carga viral destes vírus em amostras da saída secundária, que é o esgoto tratado e liberado na Baía de Guanabara, demonstra a eficiência do tratamento de esgoto.
- A grande diferença observada na taxa de detecção de SaV em amostras humanas (3,5%) em relação às amostras de esgoto (33%) sugere que os SaV causam principalmente infecções assintomáticas.
- A frequência e concentração dos SaV no esgoto bruto foi significativamente maior nos meses mais chuvosos, apresentando um padrão de sazonalidade distinto em relação ao descrito na literatura.
- O sequenciamento das amostras positivas para SaV revelou diversidade genética maior em amostras clínicas em relação às amostras ambientais. Entretanto, a metodologia empregada – sequenciamento direto dos produtos de amplificação de PCR, também implica em perda de informações em relação aos genótipos menos prevalentes.

7 PERSPECTIVAS

Realizar sequenciamento parcial do genoma dos NoV GI e GII detectados em amostras clínicas e ambientais a fim de se avaliar e correlacionar a diversidade genética destes vírus.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson WE, Gunson RN, Maclean A, Carman WF. Emergence of a new norovirus variant in Scotland in 2006. *J Clin Microbiol* 2007; 45(12):4058-4060.

Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis*. 1969; 119: 668-73.

Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, Koopmans M, Lopman BA. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014; 14(8):725-30.

Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. *Arch Virol*. 2005; 150:2061–2075.

Amaral MS, Estevam GK, Penatti M, Lafontaine R, Lima IC, Spada PK, Gabbay YB, Matos NB. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110(2):215-21.

Ando T, Jin Q, Gentsch JR, Monroe SS, Noel JS, Dowell SF, et al. Epidemiologic applications of novel molecular methods to detect and differentiate small round structured viruses (Norwalk-like viruses). *J Med Virol* 1995; 47:145–52.

Andreasi MS, Cardoso DD, Fernandes SM, Tozzeti IA, Borges AM, Fiaccadori FS, Santos RA, Souza M. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103(7):741-44.

Aragão GC, Oliveira DS, Santos MC, Mascarenhas JP, Oliveira CS, Linhares AC, Gabbay YB. Molecular characterization of norovirus, sapovirus and astrovirus in children with acute gastroenteritis from Belém, Pará, Brazil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2010; 1(1), 149-158.

Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, de Lucena MS, Siqueira JA, Fumian TM, Hernandez Jd, de Oliveira CS, Oliveira Dde S, Araújo Eda C, Soares Lda S, Linhares AC, Gabbay YB. Norovirus diversity in diarrheic children from na African-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. *PLoS One*. 2013; 8(2):e56608.

Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(1):15-37.

Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, Ramani S, Hill H, Ferreira J, Graham DY. Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. *J Infect Dis*. 2014; 1;209(7):1016-22.

Bailey MS, Gallimore CI, Lines LD, Green AD, Lopman BA, Gray JJ, et al. Viral gastroenteritis outbreaks in deployed British troops during 2002-7. *J R Army Med Corps.* 2008; 154(3):156-9.

Baker K, Morris J, McCarthy N, Saldana L, Lowther J, Collinson A, et al. An outbreak of norovirus infection linked to oyster consumption at a UK restaurant, February 2010. *J Public Health.* 2011; 33(2):205-11.

Ball JM, Hardy ME, Atmar RL, Conner ME, Estes MK. Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *J Virol.* 1998; 72(2):1345-53.

Ball JM, Graham DY, Opekun AR, Gilger MA, Guerrero RA, Estes MK. Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterology.* 1999; 117(1):40-8.

Barreira DM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadovsky AD, Leite JP, Miagostovich MP, Spano LC. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J Clin Virol.* 2010; 47(1):60-64.

Beller M, Ellis A, Lee SH, Drebot MA, Jenkerson SA, Funk E, et al. Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. International consequences. *JAMA.* 1997; 278(7):563-8.

Bennett S, Maclean A, Miller R, Aitken C, Gunson R. Increased norovirus activity in Scotland in 2012 is associated with the emergence of a new norovirus GII.4 variant. *Euro Surveill.* 2013; 18(2).

Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. 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(21):11603-15.

Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Lüthi TM. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(4):1925-31.

Bhella D, Gatherer D, Chaudhry Y, et al. Structural insights into calicivirus attachment and uncoating. *J Virol.* 2008; 82:8051-8058.

Black DN, Burroughs JN, Harris TJR, Brown F. The structure and replication of calicivirus RNA. *Nature.* 1978; 274:614-5.

Blacklow NR, Dolin R, Fedson DS, et al. Acute infectious nonbacterial gastroenteritis: etiology and pathogenesis. A combined clinical staff conference at

the Clinical Center of the National Institutes of Health. *Ann Intern Med.* 1972; 76:993-1008.

Blanton LH, Adams SM, Beard RS, Wei G, Bulens SN, Widdowson MA, Glass RI, Monroe SS. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J Infect Dis.* 2006; 193:413–421.

Bon F, Ambert-Balay K, Giraudon H, Kaplon J, Le Guyader S, Pommepuy M, Gallay A, Vaillant V, de Valk H, Chikhi-Brachet R, Flahaut A, Pothier P, Kohli E. Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:4659–4664.

Bok K, Abente EJ, Realpe-Quintero M, Mitra T, Sosnovtsev SV, Kapikian AZ, Green KY. Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. *J Virol.* 2009; 83(22):11890-901.

Bok K, Parra GI, Mitra T, et al. Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108:325–330.

Bok K, Green KY. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. *N Engl J Med.* 2012; 367:2126 –2132.

Boon D, Mahar JE, Abente EJ, Kirkwood CD, Purcell RH, Kapikian AZ, Green KY, Bok K. Comparative evolution of GII.3 and GII.4 norovirus over a 31-year period. *J Virol.* 2011; 85(17):8656-66.

Borges AM, Teixeira JM, Costa PS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco Rde C, Brito WM, Leite JP, Cardoso Dd. Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101(7):721-4.

Bosch A, Guix S, Sano D, Pintó RM. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008; 19:295-301.

Bucardo F, Nordgren J, Carlsson B, Paniagua M, Lindgren PE, Espinoza F, Svensson L. Pediatric norovirus diarrhea in Nicaragua. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(8):2573-80.

Bucardo F, Carlsson B, Nordgren J, Larson G, Blandon P, Vilchez S, Svensson L. Susceptibility of children to sapovirus infections, Nicaragua, 2005-2006. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18:1875–1878.

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.

Buesa J, Collado B, Lopez-Andujar P, Abu-Mallouh R, Rodriguez Diaz J, Garcia Diaz A, Prat J, Guix S, Llovet T, Prats G, Bosch A. Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J Clin Microbiol* 2002; 40(8):2854-59.

Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(7):1079-85.

Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(2):327-33.

Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol.* 2007; 88:3347-59.

Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, White PA. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog.* 2010; 26: 6(3):e1000831.

Bull, RA and White, PA, Mechanisms of GII.4 norovirus evolution. *Trends Microbiol,* 2011. 19(5): p. 233-40.

Bull RA, Eden JS, Luciani F, McElroy K, Rawlinson WD, White PA. Contribution of intra- and interhost dynamics to norovirus evolution. *J Virol.* 2012; 86(6):3219-29.

Burroughs JN, Brown F. Presence of a covalently linked protein on caliciviral RNA. *J Gen Virol.* 1978; 41:443–6.

Calgua B, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Suñen E, Calvo M, Bofill-Mas S, Girones R. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J Virol Methods.* 2013; 187(2):215-21.

Cannon JL, Lindesmith LC, Donaldson EF, Saxe L, Baric RS, Vinje J. Herd Immunity to GII.4 Noroviruses Is Supported by Outbreak Patient Sera. *J Virol.* 2009; 83, 5363–5374.

Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinje J, Rácz ML. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in São Paulo State, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(11):3947-53.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Norovirus activity-United States, 2006–2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2007; 56:842–46.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Norovirus outbreaks on three college campuses - California, Michigan, and Wisconsin, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58(39):1095-100.

Centers for Disease Control and Prevention. Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. *MMWR Recomm Rep*. 2011; 60(RR-3):1-18.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for foodborne disease outbreaks--United States, 2009-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013; 25;62(3):41-7.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Global Burden of Norovirus and Prospects for Vaccine Development. 2015. [Acesso em 18 de maio de 2016]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/norovirus/downloads/global-burden-report.pdf>

Cheetham S, Souza M, Meulia T, et al. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol*. 2006; 80:10372–10381.

Chen R, Neill JD, Noel JS, Hutson AM, Glass RI, Estes MK, Prasad BV. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J Virol*. 2004; 78(12):6469-79.

Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T, Fukui S. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol*. 1979; 4:249 –254.

Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Terashima H, Horino K, Nakao T. Fecal shedding of virus in relation to the days of illness in infantile gastroenteritis due to calicivirus. *J Infect Dis*. 1980; 142:247–249.

Chhabra P, Payne DC, Szilagyi PG, Edwards KM, Staat MA, Shirley SH, Wikswo M, Nix WA, Lu X, Parashar UD, Vinje J. Etiology of viral gastroenteritis in children < 5 years of age in the United States, 2008-2009. *J Infect Dis*. 2013; 208:790–800.

Cubitt WD, McSwiggan DA, Moore W. Winter vomiting disease caused by calicivirus. *J Clin Pathol*. 1979; 32:786 –793.

Cubitt WD, McSwiggan DA, Arstall S. An outbreak of calicivirus infection in a mother and baby unit. *J Clin Pathol*. 1980; 33:1095–1098.

Cubitt WD, McSwiggan DA. Seroepidemiological survey of the prevalence of antibodies to a strain of human calicivirus. *J Med Virol*. 1987; 21:361–368.

Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J*. 2003; 22(11):2852-9.

de Andrade Jda S, Rocha MS, Carvalho-Costa FA, Fioretti JM, Xavier Mda P, Nunes ZM, Cardoso J, Fialho AM, Leite JP, Miagostovich MP. Noroviruses

associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. *J Clin Virol*. 2014; 61(3):345-52.

de Graaf M, van Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F, Templeton K, Mans J, Nordgren J, Reuter G, et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Euro Surveill*. 2015; 20(26). pii: 21178.

de Graaf M, van Beek J, Koopmans MP. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14(7):421-33.

de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Wannet WJ, Vinje J, van Leusden F, Bartelds AI, van Duynhoven YT. Sensor, a population- based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol*. 2001; 154:666–674.

Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF, Baric RS. Norovirus immunity and the great escape. *PLoS Pathog*. 2012; 8(10): e1002921.

De Leon R, Matsui SM, Baric RS, Herrmann JE, Blacklow NR, Greenberg HB, et al. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J Clin Microbiol*. 1992; 30:3151–7.

Dey SK, Phan GT, Nishimura S, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H. Molecular and epidemiological trend of sapovirus, and astrovirus infection in Japan. *J Trop Pediatr*. 2010; 56:205–207.

Dey SK, Phathamavong O, Nguyen TD, Thongprachum A, Chan-It W, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Seasonal pattern and genotype distribution of sapovirus infection in Japan, 2003-2009. *Epidemiol Infect*. 2012; 140:74 –77.

Di Bartolo I, Ponterio E, Battistone A, Bonomo P, Cicala A, Mercurio P, Triassi M, Pennino F, Fiore L, Ruggeri FM. Identification and Genotyping of Human Sapoviruses Collected from Sewage Water in Naples and Palermo, Italy, in 2011. *Food Environ Virol*. 2013; 5, 236–240.

Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN. Human enteric Caliciviridae: The complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *J Gen Virol*. 1995; 76: 2349-2355.

Dingle KE; Norovirus Infection Control in Oxfordshire Communities Hospitals. Mutation in a Lordsdale norovirus epidemic strain as a potential indicator of transmission routes. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(9):3950-7.

Doane FW. Electron microscopy for the detection of gastroenteritis viruses. In A. Z. Kapikian, editor. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. Marcel Dekker. New York, N.Y. 1994. p. 101–130.

Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA, et al. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1972; 140(2):578-83.

Dolin R, Reichman RC, Roessner KD, Tralka TS, Schooley RT, Gary W, et al. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis.* 1982; 146:184–189.

Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev.* 2008; 225:190–211.

Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Viral shapeshifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8:231–41.

Dos Anjos K, Lima LM, Silva PA, Inoue-Nagata AK, Nagata T. The possible molecular evolution of sapoviruses by inter- and intra-genogroup recombination. *Arch Virol.* 2011; 156(11):1953-9.

Dove W, Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneux ME, Nakagomi O, Hart CA. Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol.* 2005; 77(4):522-7.

Eden JS, Bull RA, Tu E, McIver CJ, Lyon MJ, Marshall JA, Smith DW, Musto J, Rawlinson WD, White PA. Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008. *J Clin Virol.* 2010; 49(4):265-71.

Elfving K, Andersson M, Msellem MI, Welinder-Olsson C, Petzold M, Björkman A, Trollfors B, Mårtensson A, Lindh M. Real-time PCR threshold cycle cutoffs help to identify agents causing acute childhood diarrhea in Zanzibar. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(3):916-23.

Fankhauser 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.* 1998; 178(6):1571-8.

Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, Ando T, Glass RI. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 2002; 186(1):1-7.

Farkas T, Zhong WM, Jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martinez N, Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK, Jiang X. Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol.* 2004; 149; 1309–1323.

Farkas T, Deng X, Ruiz-Palacios G, Morrow A, Jiang X. Development of an enzyme immunoassay for detection of sapovirus-specific antibodies and its application in a study of seroprevalence in children. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:3674–3679.

Fernández MD, Torres C, Poma HR, Riviello-López G, Martínez LC, Cisterna DM, Rajal VB, Nates SV, Mbayed VA. Environmental surveillance of norovirus in Argentina revealed distinct viral diversity patterns, seasonality and spatio-temporal diffusion processes. *Sci Total Environ.* 2012; 437:262-9.

Ferreira MS, Xavier MP, Fumian TM, Victoria M, Oliveira SA, Pena LH, Leite JP, Miagostovich MP. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. *J Med Virol.* 2008; 80(2):338-44.

Ferreira MS, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MP, Fioretti JM, Andrade J, Volotão EM, Rocha M, Leite JP, Miagostovich MP. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005-2008. *J Med Virol.* 2010a; 82(8):1442-48.

Ferreira RG, Borges AMT, Fiaccadori FS, Souza MBLD, Santos RAT, Cardoso DDP. Gastroenteric virus detection in fecal samples from woman in Goiânia, State of Goiás, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010b; 43(3): 240-43.

Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM, de Assis RM, Carvalho Costa FA, de Oliveira SA, Leite JP, Miagostovich MP. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994 2008). *PLoS One.* 2012; 7(3):e33754.

Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, Vieira CB, Xavier Mda P, Leite JP, Miagostovich MP. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106(8):942-7.

Fonager, J., L.S. Hindbaek, and T.K. Fischer, Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012. *Euro Surveill.* 2013; 18(9).

Frange P, Touzot F, Debre M, Heritier S, Leruez-Ville M, Cros G, Rouzioux C, Blanche S, Fischer A, Avettand-Fenoel V. Prevalence and clinical impact of norovirus fecal shedding in children with inherited immune deficiencies. *J Infect Dis.* 2012; 206:1269 –1274.

Fukumi H, Nakaya R, Hatta S, Noriki H, Yunoki H, Akagi K, et al. An indication as to identity between the infectious diarrhea in Japan and the afebrile infectious nonbacterial gastroenteritis by human volunteer experiments. *Jpn J Med Sci Biol* 1957; 10(1):1-17.

Fumian TM, Leite JP, Marin VA, Miagostovich MP. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. *J Virol Methods.* 2009; 155(1):39-43.

Fumian TM, Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, Siqueira JA, Soares LS, Linhares AC, Gabbay YB. 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 TM, Vieira CB, Leite JPG, Miagostovich MP. Assessment of burden of virus agents in urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health.* 2013; 11:110-9.

Fumian TM, Leite JP, Rocha MS, de Andrade JS, Fioretti JM, de Assis RM, Assis MR, Fialho AM, Miagostovich MP. Performance of a one-step quantitative duplex RT-PCR for detection of rotavirus A and noroviruses GII during two periods of high viral circulation. *J Virol Methods.* 2016; 228:123-9.

Gabbay YB, Glass RI, Monroe SS, Carcamo C, Estes MK, Mascarenhas JD, et al. Prevalence of antibodies to Norwalk virus among Amerindians in isolated Amazonian communities. *Am J Epidemiol.* 1994; 1;139(7):728-33.

Gallimore CI, Lewis D, Taylor C, Cant A, Gennery A, Gray JJ. Chronic excretion of a norovirus in a child with cartilage hair hypoplasia (CHH). *J Clin Virol.* 2004; 30(2):196-204.

Gao Z, Liu B, Huo D, Yan H, Jia L, Du Y, Qian H, Yang Y, Wang X, Li J, Wang Q. Increased norovirus activity was associated with a novel norovirus GII.17 variant in Beijing, China during winter 2014-2015. *BMC Infect Dis.* 2015; 15:574.

Georgiadou SP, Loukeris D, Smilakou S, Daikos GL, Sipsas NV. Effective control of an acute gastroenteritis outbreak due to norovirus infection in a hospital ward in Athens, Greece, April 2011. *Euro Surveill.* 2011; 14;16(28).

Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee JS, Monroe SS. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis.* 2000a; 181 Suppl 2:S254-61.

Glass PJ, White LJ, Ball JM, Leparco-Goffart I, Hardy ME, Estes MK. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol.* 2000b; 74(14):6581-91.

Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2009; 361:1776–1785.

González GG, Liprandi F, Ludert JE. Molecular epidemiology of enteric viruses in children with sporadic gastroenteritis in Valencia, Venezuela. *J Med Virol.* 2011; 83(11):1972-82.

Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, et al. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep.* 2005; 6(10):968-72.

Gordon I, Ingraham HS, Kornis RF. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J Exper Med.* 1947; 86, 409.

Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis.* 1994; 170:34–43.

Green J, Gallimore CI, Norcott JP, Lewis D, Brown DW. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol.* 1995; 47:392–8.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 2000; 181 Suppl 2:S322-30.

Green KY, Belliot G, Taylor JL, Valdesuso J, Lew JF, Kapikian AZ, et al. A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *J Infect Dis.* 2002; 15;185(2):133-46.

Green KY, Chanock RM, Kapikian AZ. Human caliciviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 949–980.

Green KY. Norovirus infection in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20:717–723.

Greenberg HB, Valdesuso JR, Kalica AR, Wyatt RG, McAuliffe VJ, Kapikian AZ, Chanock RM. Proteins of Norwalk virus. *J Virol.* 1981; 37(3):994-999.

Guerrero RA, Ball JM, Krater SS, Pacheco SE, Clements JD, Estes MK. 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.

Gunn RA, Janowski HT, Lieb S, Prather EC, Greenberg HB. Norwalk virus gastroenteritis following raw oyster consumption. *Am J Epidemiol.* 1982; 115(3):348-51.

Gutiérrez-Escolano AL, Brito ZU, del Angel RM, Jiang X. Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol.* 2000; 74(18):8558-62.

Gutiérrez-Escolano AL, Vázquez-Ochoa M, Escobar-Herrera J, Hernández-Acosta J. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 311(3):759-66.

- Hale A, Mattick K, Lewis D, Estes M, Jiang X, Green J, et al. Distinct epidemiological patterns of Norwalk-like virus infection. *J Med Virol.* 2000; 62(1):99-103.
- Hall AJ, Rosenthal M, Gregoricus N, Greene SA, Ferguson J, Henao OL, Vinjé J, Lopman BA, Parashar UD, Widdowson MA. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004-2005. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(8):1381-8.
- Hall AJ, Wikswo ME, Manikonda K, Roberts VA, Yoder JS, Gould LH. Acute gastroenteritis surveillance through the National Outbreak Reporting System, United States. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19:1305–1309.
- Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, Ushijima H, Takeda N, Katayama K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol.* 2004; 150:21–36.
- Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, Ushijima H, Takeda N, Katayama K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol.* 2005; 150:21–36.
- Hansman GS, Guntapong R, Pongsuwanna Y, Natori K, Katayama K, Takeda N. 2006. Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens. *Arch Virol.* 2006; 151:551–561.
- Hansman GS, Sano D, Ueki Y, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T. Sapovirus in water, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2007a; 13(1):133-5.
- Hansman GS, Oka T, Okamoto R, Nishida T, Toda S, Noda M, Sano D, Ueki Y, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, Takeda N. Human sapovirus in clams, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2007b; 13(4):620-2.
- Hansman GS, Saito H, Shibata C, Ishizuka S, Oseto M, Oka T, Takeda N. Outbreak of gastroenteritis due to sapovirus. *J Clin Microbiol.* 2007c; 45(4):1347-9.
- Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, Nakashima R, Shimada Y, et al. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan. *J Med Virol.* 2009; 81:1117–1127.
- Harada S, Oka T, Tokuoka E, Kiyota N, Nishimura K, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Wakita T, Wang Q, Saif LJ, Katayama K. A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. *Arch Virol.* 2012; 157:1999 –2003.
- Harada S, Tokuoka E, Kiyota N, Katayama K, Oka T. Phylogenetic analysis of the nonstructural and structural protein encoding region sequences, indicating successive appearance of genomically diverse sapovirus strains from gastroenteritis patients. *Jpn J Infect Dis.* 2013; 66:454– 457.

Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Yamashita H, Tajima A, Nakajima H, Ohgaki S. Seasonal profiles of human noroviruses and indicator bacteria in a wastewater treatment plant in Tokyo, Japan. *Water Sci Technol*. 2006; 54(11-12):301-8.

Haramoto E, Katayama H, Phanuwat C, Ohgaki S. Quantitative detection of sapoviruses in wastewater and river water in Japan. *Lett Appl Microbiol*. 2008; 46:408 – 413.

Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; 253:1-8.

Hasing ME, Lee BE, Preiksaitis JK, Tellier R, Honish L, Senthilselvan A, Pang XL. Emergence of a new norovirus GII.4 variant and changes in the historical biennial pattern of norovirus outbreak activity in Alberta, Canada, from 2008 to 2013. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(7):2204-11.

Hassan-Ríos E, Torres P, Muñoz E, Matos C, Hall AJ, Gregoricus N, Vinjé J. Sapovirus gastroenteritis in preschool center, Puerto Rico, 2011. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19(1):174-5.

Hedlund KO, Rubilar-Abreu E, Svensson L. Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994-1998. *J Infect Dis*. 2000; 181(Suppl 2): S275–S280.

Herbst-Kralovetz M, Mason HS, Chen Q. Norwalk virus-like particles as vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2010; 9(3):299-307.

Hewitt J, Bell D, Simmons GC, Rivera-Aban M, Wolf S, Greening GE. Gastroenteritis outbreak caused by waterborne norovirus at a New Zealand ski resort. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(24):7853-7.

Honma S, Nakata S, Kinoshita-Numata K, Kogawa K, Chiba S. Evaluation of nine sets of PCR primers in the RNA dependent RNA polymerase region for detection and differentiation of members of the family Caliciviridae, Norwalk virus and Sapporo virus. *Microbiol Immunol*. 2000; 44:411–419.

Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol*. 2004; 12:279-287.

Iizuka S, Oka T, Tabara K, Omura T, Katayama K, Takeda N, Noda M. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. *J Med Virol*. 2010; 82:1247–1254.

Iizuka S, Takai-Todaka R, Ohshiro H, Kitajima M, Wang Q, Saif LJ, Wakita T, Noda M, Katayama K, Oka T. Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams. *Food Environ Virol*. 2013; 5:119 –125.

Iritani N, Seto Y, Kubo H, Haruki K, Ayata M, Ogura H. Prevalence of "Norwalk-like virus" infections in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis observed during the 1999-2000 season in Osaka City, Japan. *J Med Virol.* 2002; 66(1):131-8.

Iritani N, Kaida A, Abe N, Kubo H, Sekiguchi JI, Yamamoto SP, Goto K, Tanaka T, Noda M. Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. *J Med Virol.* 2014; 86:2019–2025.

Iturriza-Gomara M, Elliot AJ, Dockery C, Fleming DM, Gray JJ. Structured surveillance of infectious intestinal disease in pre-school children in the community: 'The Nappy Study.' *Epidemiol Infect.* 2009; 137:922–931.

Ike AC, Hartelt K, Oehme RM, Brockmann SO. Detection and characterization of sapoviruses in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany. *J Clin Virol.* 2008; 43:37–41.

Iwai M, Hasegawa S, Obara M, Nakamura K, Horimoto E, Takizawa T, Kurata T, Sogen S, Shiraki K. Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Toyama, Japan (2006 to 2008). *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75:1264–1270.

Iwakiri A, Ganmyo H, Yamamoto S, Otao K, Mikasa M, Kizoe S, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion. *Arch Virol.* 2009; 154:689–693.

Jiang X, Graham DY, Wang K, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science.* 1990; 250:1580-1583.

Jiang X, Wang J, Graham DY, Estes MK. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *Clin Microbiol.* 1992a; 30: 2529-2534.

Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of Norwalk virus capsid protein. *J Virol.* 1992b; 66: 6527-6532.

Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology.* 1993; 195(1):51-61.

Jiang X, Matson DO, Velazquez FR, Calva JJ, Zhong WM, Hu J, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK. Study of Norwalk-related viruses in Mexican children. *J Med Virol.* 1995; 47(4):309-16.

Jiang X, Zhong W, Kaplan M, Pickering LK, Matson DO. Expression and characterization of Sapporo-like human calicivirus capsid proteins in baculovirus. *J Virol Methods.* 1999; 78:81–91.

Johansen K, Mannerqvist K, Allard A, Andersson Y, Burman LG, Dillner L, Hedlund KO, Jonsson K, Kumlin U, Leitner T, et al. Norovirus strains belonging to the GII.4 genotype dominate as a cause of nosocomial outbreaks of viral gastroenteritis in Sweden 1997--2005. Arrival of new variants is associated with large nation-wide epidemics. *J Clin Virol.* 2008; 42(2):129-34.

Johnsen CK, Midgley S, Bottiger B. Genetic diversity of sapovirus infections in Danish children 2005-2007. *J Clin Virol.* 2009; 46:265–269.

Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis.* 1990; 161, 18–21.

Jordan WS, Jr. Gordon I, Dorrance W.R. A study of illness in a group of Cleveland families. VII. Transmission of acute nonbacterial gastroenteritis to volunteers: Evidence for two different etiologic agents. *J Exper Med.* 1953; 98, 461.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, 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):1548-57.

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 infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.* 1972; 10(5):1075-81.

Katayama, H., Shimasaki, A., and Ohgaki, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(3), 1033-9.

Katayama K, Miyoshi T, Uchino K, Oka T, Tanaka T, Takeda N, Hansman GS. Novel recombinant sapovirus. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(10):1874-6.

Katayama H, Haramoto E, Oguma K, Yamashita H, Tajima A, Nakajima H, Ohgaki S. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res.* 2008; 42(6-7):1441-8.

Karst SM. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses.* 2010; 2(3):748-81.

Karsten C, Baumgarte S, Friedrich AW, von Eiff C, Becker K, Wosniok W, Ammon A, Bockemühl J, Karch H, Huppertz HI. Incidence and risk factors for community-acquired acute gastroenteritis in north-west Germany in 2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28(8):935-43.

Keller R, Justino JF, Cassini ST. Assessment of water and seafood microbiology quality in a mangrove region in Vitória, Brazil. *J Water Health.* 2013; 11(3):573-80.

- Kim DS, Hosmillo M, Alfajaro MM, Kim JY, Park JG, Son KY, Ryu EH, Sorgeloos F, Kwon HJ, Park SJ, et al. Both alpha 2,3- and alpha 2,6- linked sialic acids on O-linked glycoproteins act as functional receptors for porcine sapovirus. *PLoS Pathog.* 2014; 10:e1004172.
- Kitajima M, Haramoto E, Phanuwat C, Katayama H, Ohgaki S. Detection of genogroup IV norovirus in wastewater and river water in Japan. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 49(5):655-8.
- Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Katayama H, Takeda N, Katayama K, Ohgaki S. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2010a; 76:2461–2467.
- Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. *Environ Sci Technol.* 2010b; 44(18):7116-22.
- Kitajima M, Haramoto E, Phanuwat C, Katayama H. Genotype distribution of human sapoviruses in wastewater in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(12):4226-9.
- Kitajima M, Haramoto E, Phanuwat C, Katayama H, Furumai H. Molecular detection and genotyping of human noroviruses in influent and effluent water at a wastewater treatment plant in Japan. *J Appl Microbiol.* 2012; 112(3):605-13.
- Kitajima M, Iker BC, Pepper IL, Gerba CP. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes--identification of potential viral indicators. *Sci Total Environ.* 2014; 488-489:290-6.
- Kiulia NM, Netshikweta R, Page NA, Van Zyl WB, Kiraithe MM, Nyachio A, Mwenda JM, Taylor MB. The detection of enteric viruses in selected urban and rural river water and sewage in Kenya, with special reference to rotaviruses. *J Appl Microbiol.* 2010; 109(3):818-28.
- Kobayashi S, Fujiwara N, Yasui Y, Yamashita T, Hiramatsu R, Minagawa H. A foodborne outbreak of sapovirus linked to catered box lunches in Japan. *Arch Virol.* 2012; 157:1995–1997.
- Kobayashi M, Yoshizumi S, Kogawa S, Takahashi T, Ueki Y, Shinohara M, Mizukoshi F, Tsukagoshi H, Sasaki Y, Suzuki R, et al. Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I. *Sci Rep.* 2015; 5:13806.
- Kojima S, Fukumi H, Kusama H, Yamamoto S, Suzuki S, Uchida T, et al. Studies on the causative agent of the infectious diarrhoea. Records of the experiments on human volunteers. *Jpn Med J.* 1948; 1:467.

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; 100:107–114.

Kreutz LC, Seal BS, Mengeling WL. Early interaction of feline calicivirus with cells in culture. *Arch Virol*. 1994; 136:19-34.

Kroneman A, Verhoef L, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y, et al. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(9):2959-65.

Kroneman A, Vennema H, Deforche K, v d Avoort H, Peñaranda S, Oberste MS, Vinjé J, Koopmans M. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol*. 2011; 51(2):121-5.

Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol*. 2013; 158(10):2059-68.

Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, von Bonsdorff CH. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis*. 1999; 180:1771–6.

La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Muscillo M. Detection of genogroup IV noroviruses in environmental and clinical samples and partial sequencing through rapid amplification of cDNA ends. *Arch Virol*. 2008; 153(11):2077-83.

La Rosa G, Iaconelli M, Pourshaban M, Fratini M, Muscillo M. Molecular detection and genetic diversity of norovirus genogroup IV: a yearlong monitoring of sewage throughout Italy. *Arch Virol*. 2010; 155(4):589-93.

Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science*. 1993; 22;259(5094):516-9.

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; 8(9):e72788.

Larsson MM, Rydell GE, Grahn A, Rodriguez-Diaz J, Akerlind B, Hutson AM, et al. Antibody prevalence and titer to norovirus (genogroup II) correlate with secretor (FUT2) but not with ABO phenotype or Lewis (FUT3) genotype. *J Infect Dis*. 2006; 15;194(10):1422-7.

Le Guyader FS, Mittelholzer C, Haugarreau L, Hedlund KO, Alsterlund R, Pommepuy M, Svensson L. Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *Int J Food Microbiol.* 2004; 97(2):179-86.

Lee LE, Cebelinski EA, Fuller C, Keene WE, Smith K, Vinje J, Besser JM. Sapovirus outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002-2009. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18:873–876.

Leers WD, Kasupski G, Fralick R, Wartman S, Garcia J, Gary W. Norwalk-like gastroenteritis epidemic in a Toronto hospital. *Am J Public Health.* 1987; 77(3):291-5.

Lekana-Douki SE, Kombila-Koumavor C, Nkoghe D, Drosten C, Drexler JF, Leroy EM. Molecular epidemiology of enteric viruses and genotyping of rotavirus A, adenovirus and astrovirus among children under five years old in Gabon. *Int. J. Infect. Dis.* 2015; 34:90–95.

Lin H, Ng S, Chan S, Chan WM, Lee KC, Ho SC, et al. Institutional risk factors for norovirus outbreaks in Hong Kong elderly homes: a retrospective cohort study. *BMC Public Health.* 2011; 11;11:297.

Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L. et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med.* 2003; 9:548–553.

Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinje J, Baric RS. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.* 2008; 5(2):e31.

Lindesmith LC, Donaldson E, Leon J, Moe CL, Frelinger JA, Johnston RE, Weber DJ, Baric RS. Heterotypic humoral and cellular immune responses following Norwalk virus infection. *J Virol.* 2010; 84(4): 1800–15.

Lindesmith LC, Donaldson EF, Baric RS. Norovirus GII.4 strain antigenic variation. *J Virol.* 2011; 85(1): 231–42.

Lindesmith LC, Beltramello M, Donaldson EF, Corti D, Swanstrom J, Debbink K, Lanzavecchia A, Baric RS. Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. *PLoS Pathog.* 2012; 8(5):e1002705.

Liu J, Kibiki G, Maro V, Maro A, Kumburu H, Swai N, et al., Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. *J. Clin. Virol.* 2011; 50(4):308–313.

Liu X, Yamamoto D, Saito M, Imagawa T, Ablola A, Tandoc AO 3rd, Segubre-Mercado E, Lupisan SP, Okamoto M, Furuse Y, Saito M, Oshitani H. Molecular detection and characterization of sapovirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in the Philippines. *J Clin Virol.* 2015; 68:83-8.

Lodder WJ, de Roda Husman AM. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(3):1453-61.

Lopman BA, Brown DW, Koopmans M. Human caliciviruses in Europe. *J Clin Virol.* 2002; 24:137-160.

Lopman B, Vennema H, Kohli E, Pothier P, Sanchez A, Negredo A, Buesa J, Schreier E, Reacher M, Brown D, et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet.* 2004; 363(9410):682-8.

Lopman B, Simmons K, Gambhir M, Vinjé J, Parashar U. Epidemiologic implications of asymptomatic reinfection: a mathematical modeling study of norovirus. *Am J Epidemiol.* 2014; 179(4):507-12.

Lyman WH, Walsh JF, Kotch JB, Weber DJ, Gunn E, Vinje J. Prospective study of etiologic agents of acute gastroenteritis outbreaks in child care centers. *J Pediatr.* 2009; 154:253–257.

Maeda Y, Tohya Y, Matsuura Y, Mochizuki M, Sugimura T. Early interaction of canine calicivirus with cells is the major determinant for its cell tropism in vitro. *Vet Microbiol.* 2002; 22;87(4):291-300.

Mans J, de Villiers JC, du Plessis NM, Avenant T, Taylor MB. Emerging norovirus GII.4 2008 variant detected in hospitalised paediatric patients in South Africa, *J. Clin. Virol.* 2010; 49(4):258–264.

Mans J, Murray TY, Kiulia NM, Mwenda JM, Musoke RN, Taylor MB, Human caliciviruses detected in HIV-seropositive children in Kenya, *J Med Virol.* 2014; 86(1):75–81.

Marques Mendanha de Oliveira D, Souza M, Souza Fiaccadori F, César Pereira Santos H, das Dôres de Paula Cardoso D. Monitoring of Calicivirus among day-care children: evidence of asymptomatic viral excretion and first report of GI.7 Norovirus and GI.3 Sapovirus in Brazil. *J Med Virol.* 2014; 86(9):1569-75.

Martella V, Lorusso E, Decaro N, Elia G, Radogna A, D'Abramo M, et al. Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(8):1306-8.

Matson DO, Estes MK, Tanaka T, Bartlett AV, Pickering LK. Asymptomatic human calicivirus infection in a day care center. *Pediatr Infect Dis J.* 1990; 9:190 –196.

Matthews RE. Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology.* 1979; 12(3-5):129-296.

Matussek A, Dienus O, Djeneba O, Simpore J, Nitiema L, Molecular characterization and genetic susceptibility of sapovirus in children with diarrhoea in Burkina Faso. *Infect Genet Evol.* 2015; 32:369–400.

McSwiggan DA, Cubitt D, Moore W. Calicivirus associated with winter vomiting disease. *Lancet.* 1978; i:1215.

Melgaço FG, Victoria M, Corrêa AA, Ganime AC, Malta FC, Brandão ML, de Mello Medeiros V, de Oliveira Rosas C, Bricio SM, Miagostovich MP. Virus recovering from strawberries: Evaluation of a skimmed milk organic flocculation method for assessment of microbiological contamination. *Int J Food Microbiol.* 2016; 217:14-9.

Miagostovich MP, Ferreira FF, Guimarães FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SL, Silva LA, Leite JP. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(2):375-82.

Mikula C, Springer B, Reichart S, Bierbacher K, Lichtenschopf A, Hoehne M. Sapovirus in adults in rehabilitation center, upper Austria. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16:1186 –1187.

Miyoshi M, Yoshizumi S, Kanda N, Karino T, Nagano H, Kudo S, Okano M, Ishida S. Different genotypic sapoviruses detected in two simultaneous outbreaks of gastroenteritis among schoolchildren in the same school district in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2010; 63:75–78.

Moresco V, Viancelli A, Nascimento MA, Souza DS, Ramos AP, Garcia LA, Simões CM, Barardi CR. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. *Mar Pollut Bull.* 2012; 64(1):40-8.

Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Ribeiro CD, Calux SJ, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Norovirus 3rd Generation kit: an improvement for rapid diagnosis of sporadic gastroenteritis cases and valuable for outbreak detection. *J Virol Methods.* 2011a; 173(1):13-6.

Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Ribeiro CD, Calux SJ, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Large gastroenteritis outbreak due to norovirus GII in São Paulo, Brazil, summer 2010. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2011b; 53:119–120.

Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, et al. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J Virol.* 2010; 84(16):8085-97.

Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis.* 2000; 181 Suppl 2:S284-287.

Muscillo M, Fratini M, Graffeo R, Sanguinetti M, Martella V, Green KY, Della Libera S, La Rosa G. GIV Noroviruses in Wastewaters and in Stool Specimens from Hospitalized Patients. *Food Environ Virol.* 2013; 5:194-202.

Murray TY, Mans J, Taylor MB. First detection of human sapoviruses in river water in South Africa. *Water Sci Technol.* 2013a; 67:2776 –2783.

Murray TY, Mans J, Taylor MB. Human calicivirus diversity in wastewater in South Africa. *J Appl Microbiol.* 2013b; 114:1843–1853.

Murray TY, Taylor MB. Quantification and molecular characterisation of human sapoviruses in water sources impacted by highly polluted discharged wastewater in South Africa. *J Water Health.* 2015; 13(4):1055-9.

Naing Z, Rayner B, Killikulangara A, Vunnam K, Leach S, McIver CJ, Scott GM, Craig ME, Lui K, Rawlinson WD. Prevalence of viruses in stool of premature neonates at a neonatal intensive care unit. *J Paediatr Child Health.* 2013; 49:E221–E226.

Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FM, Cuevas LE, Cunliffe NA, Hart CA. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol* 2008;153(5):957-60.

Nakata S, Chiba S, Terashima H, Yokoyama T, Nakao T. Humoral immunity in infants with gastroenteritis caused by human calicivirus. *J Infect Dis.* 1985; 152:274–279.

Nakata S, Estes MK, Chiba S. Detection of human calicivirus antigen and antibody by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol.* 1988; 26:2001–2005.

Nakata S, Honma S, Numata K, Kogawa K, Ukae S, Adachi N, Jiang X, Estes MK, Gatheru Z, Tukey PM, Chiba S. Prevalence of human calicivirus infections in Kenya as determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:3160– 3163.

Nakata S, Honma S, Numata KK, Kogawa K, Ukae S, Morita Y, Adachi N, Chiba S. Members of the family caliciviridae (Norwalk virus and Sapporo virus) are the most prevalent cause of gastroenteritis outbreaks among infants in Japan. *J Infect Dis.* 2000; 181:2029 –2032.

Neill JD, Mengeling WL. Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res.* 1998; 11:59-72.

Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, et al. Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol.* 2010; 30;139 Suppl 1:S3-15.

Noel JS, Liu BL, Humphrey CD, Rodriguez EM, Lambden PR, Clarke IN, Dwyer DM, Ando T, Glass RI, Monroe SS. Parkville virus: a novel genetic variant of human calicivirus in the Sapporo virus clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adults. *J Med Virol.* 1997; 52:173–178.

Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, Monroe SS, Glass RI. Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution. *J Infect Dis.* 1999; 179(6):1334-44.

Nordgren J, Matussek A, Mattsson A, Svensson L, Lindgren PE. Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Res.* 2009; 43(4):1117-25.

Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, White PA, Takeda N. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 2006; 78(10):1347-53.

Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol.* 2012; 157; 349 –352.

Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(1):32-53.

Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K. Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol.* 2006; 151(8):1635-41.

Okada M, Ogawa T, Yoshizumi H, Kubonoya H, Shinozaki K. Genetic variation of the norovirus GII-4 genotype associated with a large number of outbreaks in Chiba prefecture, Japan. *Arch Virol.* 2007; 152(12):2249-52.

OMS (Organização Mundial de Saúde – World Health Organization). Preventing diarrhoea through better water, sanitation and hygiene: exposures and impacts in low- and middle-income countries. Geneva, Suíça: Organização Mundial de Saúde; 2014.

OMS (Organização Mundial de Saúde – World Health Organization) e UNICEF. Progress on Sanitation and Drinking Water – 2015 update and MDG assessment. Geneva, Suíça: Organização Mundial de Saúde e UNICEF; 2015.

Page N, Groome MJ, Murray T, Nadan S, Netshikweta R, Keddy KH, Poonsamy B, Moyes J, Walaza S, Kahn K, et al. Sapovirus prevalence in children less than five years of age hospitalised for diarrhoeal disease in South Africa, 2009-2013. *J Clin Virol.* 2016; 78:82-8.

- Pang XL, Honma S, Nakata S, Vesikari T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis.* 2000; 181 Suppl 2:S288-94.
- Pang XL, Lee BE, Tyrrell GJ, Preiksaitis JK. Epidemiology and genotype analysis of sapovirus associated with gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2004-2007. *J Infect Dis.* 2009; 199:547–551.
- Pang XL, Preiksaitis JK, Lee BE. Enhanced enteric virus detection in sporadic gastroenteritis using a multi-target real-time PCR panel: a one-year study. *J Med Virol.* 2014; 86:1594 –1601.
- Parks CG, Moe CL, Rhodes D, Lima A, Barrett L, Tseng F, et al. Genomic diversity of "Norwalk like viruses" (NLVs): pediatric infections in a Brazilian shantytown. *J Med Virol.* 1999; 58(4):426-34.
- Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med.* 1977; 297:86–89.
- Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(8):1224-31.
- Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol.* 2009; 44(1):1-8.
- Pérez-Sautu U, Sano D, Guix S, Kasimir G, Pintó RM, Bosch A. Human norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment, Spain. *Environ Microbiol.* 2012; 14(2):494-502.
- Perry JW, Wobus CE. Endocytosis of murine norovirus 1 into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol. *J Virol.* 2010; 84: 6163–6176.
- Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. *J Med Virol.* 2004; 73:256– 261.
- Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Sugita K, Okitsu S, Muller WE, Ushijima H. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan during 2004–2005. *J Med Virol.* 2006; 78:839–846.
- Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007; 26:21–27.
- Phillips G, Lopman B, Tam CC, Iturriza-Gomara M, Brown D, Gray J. Diagnosing norovirus-associated infectious intestinal disease using viral load. *BMC Infect Dis.* 2009; 9:63.

Phillips G, Tam CC, Conti S, Rodrigues LC, Brown D, Iturriza-Gomara M, Gray J, Lopman B. Community incidence of norovirus-associated infectious intestinal disease in England: improved estimates using viral load for norovirus diagnosis. *Am J Epidemiol.* 2010; 171(9):1014-22.

Prasad BV, Matson DO, Smith AW. Three-dimensional structure of calicivirus. *J Mol Biol.* 1994; 240:256–264.

Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, et al. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science.* 1999; 286:287–290.

Portal TM, Siqueira JA, Costa LC, Lima IC, Lucena MS, Bandeira Rda S, Linhares Ada C, Luz CR, Gabbay YB, Resque HR. Caliciviruses in hospitalized children, São Luís, Maranhão, 1997-1999: detection of norovirus GII.12. *Braz J Microbiol.* 2016; 47(3):724-30.

Rahman M, Rahman R, Nahar S, Hossain S, Ahmed S, Golam Faruque AS, Azim T. Norovirus diarrhea in Bangladesh, 2010-2014: prevalence, clinical features, and genotypes. *J Med Virol.* 2016; 88(10):1742-50.

Rasanen S, Lappalainen S, Kaikkonen S, Hamalainen M, Salminen M, Vesikari T. Mixed viral infections causing acute gastroenteritis in children in a waterborne outbreak. *Epidemiol Infect.* 2010; 138:1227–1234.

Reeck A, Kavanagh O, Estes MK, Opekun AR, Gilger MA, Graham DY, Atmar RL. Serologic correlate of protection against norovirus-induced gastroenteritis. *J Infect Dis.* 2010; 202(8):1212–18.

Reimann HA, Hodges JH, Price AH. Epidemic diarrhea, nausea and vomiting of unknown cause. *JAMA.* 1945; 127, 1.

Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, Miagostovich MP, et al. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(2):201-6.

Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, Cotterill H, et al. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol.* 2003; 26: 109-115.

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; 35:246 –253.

Rockx BH, Bogers WM, Heeney JL, et al. Experimental norovirus infections in non-human primates. *J Med Virol.* 2005a; 75:313–320.

Rockx B, Baric RS, de Grijns I, Duizer E, Koopmans MP. Characterization of the homo and heterotypic immune responses after natural norovirus infection. *J Med Virol*. 2005b; 77(3):439–46.

Roos-Weil D, Ambert-Balay K, Lanternier F, Mamzer-Bruneel MF, Nochy D, Pothier P, et al. Impact of norovirus/sapovirus-related diarrhea in renal transplant recipients hospitalized for diarrhea. *Transplantation*. 2011; 15;92(1):61-9.

Rosenfeldt V, Vesikari T, Pang XL, Zeng SQ, Tvede M, Paerregaard A. Viral etiology and incidence of acute gastroenteritis in young children attending day-care centers. *Pediatr Infect Dis J*. 2005; 24(11):962-5.

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*. 2001; 20:849–853.

Sakuma Y, Chiba S, Kogasaka R, Terashima H, Nakamura S, Horino K, Nakao T. Prevalence of antibody to human calicivirus in general population of northern Japan. *J Med Virol*. 1981; 7:221–225.

Sano D, Perez-Sautu U, Guix S, Pinto RM, Miura T, Okabe S, Bosch A. Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77:1111–1114.

Sarvikivi E, Roivainen M, Maunula L, Niskanen T, Korhonen T, Lappalainen M, et al. Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries. *Epidemiol Infect*. 2012; 140(2):260-7.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17(1):7-15.

Scheuer KA, Oka T, Hoet AE, Gebreyes WA, Molla BZ, Saif LJ, Wang Q. Prevalence of porcine noroviruses, molecular characterization of emerging porcine sapoviruses from finisher swine in the United States, and unified classification scheme for sapoviruses. *J Clin Microbiol*. 2013; 51: 2344 –2353.

Scheuer KA, Oka T, Hoet AE, Gebreyes WA, Molla BZ, Saif LJ, Wang Q. Prevalence of porcine noroviruses, molecular characterization of emerging porcine sapoviruses from finisher swine in the United States, and unified classification scheme for sapoviruses. *J Clin Microbiol*. 2013; 51:2344 –2353.

Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. The mucosal lesion of the proximal small intestine in vacute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med*. 1973; 288, 1318–1323.

Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. The small intestinal lesion induced by Hawaii agent acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Infect Dis.* 1974; 129, 705–708.

Shioda K, Kambhampati A, Hall AJ, Lopman BA. Global age distribution of pediatric norovirus cases. *Vaccine.* 2015; 33(33):4065-8.

Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, de Bruin E, van der Veer B, Siezen RJ, and M. Koopmans. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol.* 2007a; 81(18):9932-41.

Siebenga JJ, Vennema H, Duizer E, Koopmans MP. Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4, The Netherlands, 1994-2005. *Emerg Infect Dis.* 2007b; 13(1):144-46.

Siebenga J, Kroneman A, Vennema H, Duizer E, Koopmans M. Food-borne viruses in Europe network report: the norovirus GII.4 2006b (for US named Minerva-like, for Japan Kobe034-like, for UK V6) variant now dominant in early seasonal surveillance. *Euro Surveill.* 2008; 10;13(2). pii: 8009.

Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, Ho EC, Lim W, et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis.* 2009; 200(5):802-12.

Siebenga JJ, Lemey P, Kosakovsky Pond SL, Rambaut A, Vennema H, Koopmans M. Phylodynamic reconstruction reveals norovirus GII.4 epidemic expansions and their molecular determinants. *PLoS Pathog.* 2010; 6(5):e1000884.

Silva LD, Rodrigues EL, Lucena MS, Lima IC, Oliveira Dde S, Soares LS, Mascarenhas JD, Linhares Ada C, Gabbay YB. Detection of the pandemic norovirus variant GII.4 Sydney 2012 in Rio Branco, state of Acre, northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013; 108(8):1068-70.

Siqueira JA, Linhares AD, Oliveira DD, Soares LD, Lucena MS, Wanzeller AL, Mascarenhas JD, Gabbay YB. Evaluation of third-generation RIDASCREEN enzyme immunoassay for the detection of norovirus antigens in stool samples of hospitalized children in Belém, Pará, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 71:391–395.

Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MC, Maranhão AG, Rocha LN, Ramírez ML, Monroe SS, Glass RI, Gentsch J. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(8):1244-46.

Soares CC, Cilicivirus e Astrovirus. In Santos NOS, Romanos MTV, Wigg MD. *Virologia humana* 3. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 215 – 221.

Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J Virol.* 2002; 76:7060-7072.

Souza M, Cheetham SM, Azevedo MS, Costantini V, Saif LJ. Cytokine and antibody responses in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus genogroup II.4 (HS66 strain). *J Virol.* 2007; 81(17):9183-92.

Souza M, Azevedo MS, Jung K, Cheetham S, Saif LJ. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *J Virol.* 2008; 82(4):1777-86.

Sukhrie FH, Siebenga JJ, Beersma MF, Koopmans M. Chronic shedders as reservoir for nosocomial transmission of norovirus. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(11):4303-5.

Suzuki H, Konno T, Kutsuzawa T, Imai A, Tazawa F, Ishida N, Katsushima N, Sakamoto M. The occurrence of calicivirus in infants with acute gastroenteritis. *J Med Virol.* 1979; 4:321–326.

Svraka S, Vennema H, van der Veer B, Hedlund KO, Thorhagen M, Siebenga J, Duizer E, Koopmans M. Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:2191–2198.

Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Estes MK. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin Immunol.* 2003; 108(3):241-7.

Tam CC, O'Brien SJ, Tompkins DS, Bolton FJ, Berry L, Dodds J, Choudhury D, Halstead F, Iturriza-Gomara M, Mather K, et al. Changes in causes of acute gastroenteritis in the United Kingdom over 15 years: microbiologic findings from 2 prospective, population-based studies of infectious intestinal disease. *Clin Infect Dis.* 2012; 54:1275–1286.

Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol.* 2003; 77(23):12562-71.

Teixeira DM, Hernandez JM, Silva LD, Oliveira Dde S, Spada PK, Gurjão TC, Mascarenhas JD, Linhares AC, Morais LL, Gabbay YB. Occurrence of Norovirus GIV in Environmental Water Samples from Belém City, Amazon Region, Brazil. *Food Environ Virol.* 2016; 8(1):101-4.

Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, Le Pendu J, Calderon RL. Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol.* 2008; 80(8):1468-76.

Timenetsky MCS, Kisielius JJ, Grisi SJ, Escobar AMU, Ueda M, Tanaka H. Rotavírus, Adenovírus, Astrovírus, Calicivírus e “Small Round Virus particles” em fezes de crianças, com e sem diarreia aguda, no período de 1987 a 1988, na grande São Paulo. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993; 35: 275-280.

Thornton AC, Jennings-Conklin KS, McCormick MI. Norovirus: Agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Manag & Response*. 2004; 2: 4-9.

Trang NV, Luan le T, Kim-Anh le T, Hau VT, Nhung le TH, Phasuk P, Setrabutr O, Shirley H, Vinjé J, Anh DD, et al. Detection and molecular characterization of noroviruses and sapoviruses in children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Vietnam. *J Med Virol*. 2012; 84(2):290-7.

Troeger H, Loddenkemper C, Schneider T, Schreier E, Epple H, Zeitz M, et al. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut*. 2009; 58, 1070–1077.

Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, Ando T, Glass RI, Monroe SS. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(4):1405-12.

Tse H, Chan WM, Li KS, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. Discovery and genomic characterization of a novel bat sapovirus with unusual genomic features and phylogenetic position. *PLoS One*. 2012; 7:e34987.

Tu ET, Bull RA, Greening GE, Hewitt J, Lyon MJ, Marshall JA, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus GII.4 variants 2006a and 2006b. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(3):413-20.

Usuku S, Kumazaki M, Kitamura K, Tochikubo O, Noguchi Y. An outbreak of food-borne gastroenteritis due to sapovirus among junior high school students. *Jpn J Infect Dis*. 2008; 61:438–441.

van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden J, Fonager J, Hewitt J, Iritani N, Kroneman A, Vennema H, Vinje J, White P, Koopmans M; on behalf of 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).

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(8):1389-95.

Verhoef L, Koopmans M, VAN Pelt W, Duizer E, Haagsma J, Werber D, VAN Asten L, Havelaar A. The estimated disease burden of norovirus in The Netherlands. *Epidemiol Infect*. 2013; 141(3):496-506.

Vicentini F, Denadai W, Gomes YM, Rose TL, Ferreira MS, Le Moullac-Vaidye B, Le Pendu J, Leite JP, Miagostovich MP, Spano LC. Molecular characterization of noroviruses and HBGA from infected Quilombola children in Espírito Santo State, Brazil. *PLoS One*. 2013; 8(7):e69348.

Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, Miagostovich M. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J*. 2007; 26(7):602-6.

Victoria M, Guimarães FR, Fumian TM, Ferreira FF, Vieira CB, Shubo T, Leite JP, Miagostovich MP. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health*. 2010; 8(1):158-65.

Victoria M, Fumian TM, Rocha MS, Dalmao F, Leite JP, Girones R, Miagostovich MP. Gastroenteric virus dissemination and influence of rainfall events in urban beaches in Brazil. *J Appl Microbiol*. 2014a; 117(4):1210-8.

Victoria M, Tort LF, García M, Lizasoain A, Maya L, Leite JP, Miagostovich MP, Cristina J, Colina R. Assessment of gastroenteric viruses from wastewater directly discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food Environ Virol*. 2014b; 6(2):116-24.

Victoria M, Tort LF, Lizasoain A, García M, Castells M, Berois M, Divizia M, Leite JP, Miagostovich MP, Cristina J, Colina R. Norovirus molecular detection in Uruguayan sewage samples reveals a high genetic diversity and GII.4 variant replacement along time. *J Appl Microbiol*. 2016; 120(5):1427-35.

Vieira CB, Mendes AC, Guimarães FR, Fumian TM, Leite JP, Gaspar AM, Miagostovich MP. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(6):778-84.

Vieira CB, de Abreu Corrêa A, de Jesus MS, Luz SL, Wyn-Jones P, Kay D, Vargha M, Miagostovich MP. Viruses Surveillance Under Different Season Scenarios of the Negro River Basin, Amazonia, Brazil. *Food Environ Virol*. 2016; 8(1):57-69.

Vinje J, Koopmans MP. Simultaneous detection and genotyping of “Norwalk-like viruses” by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(7): 2595–601.

Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods*. 2004; 116(2):109-17.

Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol*. 2015; 53:373–381.

- Vivancos R, Shroufi A, Sillis M, Aird H, Gallimore CI, Myers L, et al. Food-related norovirus outbreak among people attending two barbeques: epidemiological, virological, and environmental investigation. *Int J Infect Dis.* 2009; 13(5):629-35.
- Wadl M, Scherer K, Nielsen S, Diedrich S, Ellerbroek L, Frank C, et al. Food-borne norovirus-outbreak at a military base, Germany, 2009. *BMC Infect Dis.* 2010; 17;10:30.
- Wang Q, Zhang Z, Saif LJ. Stability of and attachment to lettuce by a culturable porcine sapovirus surrogate for human caliciviruses. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78:3932–3940.
- Widdowson MA, Cramer EH, Hadley L, Bresee JS, Beard RS, Bulens SN, Charles M, Chege W, Isakbaeva E, Wright JG, 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(1):27-36.
- Wikswa ME, Cortes J, Hall AJ, Vaughan G, Howard C, Gregoricus N, et al. Disease transmission and passenger behaviors during a high morbidity Norovirus outbreak on a cruise ship, January 2009. *Clin Infect Dis* 2011; 52(9):1116-22.
- White PA. Evolution of norovirus. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Aug;20(8):741-5. doi: 10.1111/1469-0691.12746.
- Wright PJ, Gunsekere IC, Doultree JC, Marshall JA. Small round-structured (Norwalk-like) viruses and classical human caliciviruses in southeastern Australia, 1980-1996. *J Med Virol* 1998; 55(4):312-20.
- Wu FT, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo CH, Liang SY, Hung CH, Dah-Shyong Jiang D, Hsin Chang J, et al. Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14:1169 –1171.
- Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, DuPont HL, Buscho RF, Thornhill TS, Kapikian AZ, Chanock RM. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis.* 1974; 129(6):709-14.
- Xavier MP, Oliveira SA, Ferreira MS, Victoria M, Miranda V, Silva MF, Strina A, Barreto ML, Miagostovicht MP, Leite JP. Detection of caliciviruses associated with acute infantile gastroenteritis in Salvador, an urban center in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42(5):438-44.
- Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo R, Oseto M, Doi M, Miyamoto T, Ueda T, Kondo H, Tanaka T, Wakita T, Katayama K, Takeda N, Oka T. Molecular characterization of Sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall. *J Med Virol.* 2010; 82:720 –726.

Yamamoto A, Zennoji H, Yanagita K, Kato S. Research into the causative agent of epidemic gastroenteritis which prevailed in Japan in 1948. *Jpn Med J.* 1948; 1:379–84.

Yen C, Wikswo ME, Lopman BA, Vinje J, Parashar UD, Hall AJ. Impact of an emergent norovirus variant in 2009 on norovirus outbreak activity in the United States. *Clin Infect Dis.* 2011; 53(6):568-71.

Yoshida T, Kasuo S, Azegami Y, Uchiyama Y, Satsumabayashi K, Shiraishi T, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. *J Clin Virol.* 2009; 45:67– 71.

Zahorsky, J. Hyperemesis hemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr.* 1929; 46:391–5.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 2006; 346:312-323.

Zheng DP, Widdowson MA, Glass RI, Vinje J. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(1):168-77.