

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

JULIANA DA SILVA RIBEIRO DE ANDRADE

**VIGILÂNCIA DOS NOROVÍRUS GII: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
RECOMBINANTES E DA VARIANTE EMERGENTE GII.P17-GII.17
KAWASAKI_2014 NO BRASIL**

Tese de doutorado apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Dra. Marize Pereira Miagostovich

Dr. Tulio Machado Fumian

RIO DE JANEIRO

2018

da Silva Ribeiro de Andrade, Juliana.

VIGILÂNCIA DOS NOROVÍRUS GII: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE RECOMBINANTES E DA VARIANTE EMERGENTE GII.P17-GII.17 KAWASAKI_2014 NO BRASIL / Juliana da Silva Ribeiro de Andrade. - Rio de janeiro, 2018.

121 f.

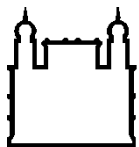
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientadora: Marize Pereira Miagostovich.

Co-orientador: Tulio Machado Fumian.

Bibliografia: f. 100-119

1. norovírus. 2. variante GII.17. 3. recombinantes. 4. Brasil. 5. análise molecular. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

JULIANA DA SILVA RIBEIRO DE ANDRADE

**VIGILÂNCIA DOS NOROVÍRUS GII: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
RECOMBINANTES E DA VARIANTE EMERGENTE GII.P17-GII.17
KAWASAKI_2014 NO BRASIL**

ORIENTADORA: Dra. Marize Pereira Miagostovich

Dr. Tulio Machado Fumian

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Flávia Barreto dos Santos – IOC Presidente

Prof^a. Dr^a. Mariela Martínéz - IOC

Prof^a. Dr^a. Tatiana Xavier Castro - UFF

Prof. Dr. Rafael Brandão Varella – UFF Suplente

Prof. Dr. Gentil Arthur Bentes – IOC Suplente

Rio de Janeiro, 29 de novembro de 2018.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de
Virologia Comparada e Ambiental do Instituto
Oswaldo Cruz / Fiocruz sob orientação da
Dra. Marize Pereira Miagostovich e
Dr. Tulio Machado Fumian.

Dedico esta tese aos meus pais Angela e Mauro e meu irmão Oscar, responsáveis por minha formação, pelo amor incondicional e pelo apoio a cada desafio e etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta tese contou com o apoio e incentivo de muitas pessoas, sem as quais não teria alcançado este objetivo e a quem serei eternamente grata.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

À minha orientadora Marize Miagostovich pelos ensinamentos, por todo suporte, disponibilidade, incentivo e ao apoio que sempre me concedeu ao longo desses quatro anos.

Ao meu coorientador Tulio Fumian por ter me instruído tantas vezes, me apoiado e ter sido além de orientador, um grande amigo nesta caminhada.

À Dr^a. Flávia Barreto pelo excelente trabalho de revisão, pelas palavras motivadoras, pela energia positiva e por aceitar fazer parte da banca examinadora desta dissertação.

Aos Drs. Gentil Arthur, Mariela Martínéz, Rafael Varella e Tatiana Xavier por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

Ao Dr. Jesus Rodriguez por aceitar que meu projeto de doutorado sanduíche fosse realizado sob sua orientação no laboratório da Universidade de Valência.

À equipe do laboratório da Universidade de Valência por permitir a realização de uma parte importante da minha tese, por me acolher tão bem.

À Cristina Santiso por ter me recebido como uma irmã e por toda ajuda, carinho e amizade.

À Maria da Penha Xavier, minha grande amiga, esteve do meu lado sempre me incentivando, com muito carinho, sempre disponível a ajudar em qualquer situação. Muitas vezes, meu porto seguro. Obrigada pelo amor e todos os sorrisos que demos juntas durante esse processo.

Aos meus pais Mauro e Angela por serem os responsáveis por tudo que alcancei até hoje, por todas minhas conquistas as quais dedico ao grande esforço deles. Pelo carinho, por todo o suporte e principalmente ao amor que sempre me deram. Nada disso seria possível sem o apoio de vocês.

À minha família: minha avó Hilda, minhas primas Andreza, Camila, Maysa, Mikael, Rudson, tia Solange, tia Angélica pelo carinho, apoio, pelo amor

incondicional e entender minha ausência muitas vezes. Agradeço mesmo aqueles que já não estão conosco, mas que tiveram papel muito importante na minha formação, meus avós Oscar, Edu e Cicina.

Leonardo Azevedo por ter estado sempre por perto mesmo quando estive longe, pelo carinho.

Camila Lopes e Yasmine Rangel por alegrarem meus dias, pelo apoio, suporte emocional e amizade.

Marcelle Figueira por sempre estar disponível para ajudar, pela amizade e me fazer rir.

Aos meus amigos por estarem do meu lado nos momentos bons e ruins, por terem me apoiado, compreendido minhas ausências e meus dias de mau humor.

A Francisca e Elioneide por serem minhas mães de coração, por cuidarem de mim com tanto carinho e por trazerem conforto para meu coração sempre que precisei.

À equipe do LVCA pelo apoio, suporte laboratorial, conhecimentos, conversas, momentos de descontração e por me ajudar quando precisei de forma direta ou indireta: Fernando César, Mônica Simões, Silvana Augusta, Tulio Fumian, Irene Araújo, Maria da Penha, Márcia Pimenta, Sérgio Mouta, Rosane Assis, Fábio Malta, Alexandre Fialho, Isabelle, Matheus Assis, Lorena Pedrosa, Pedro Ivo, Carina Cantelli, Adriana Maranhão, Marcia Teresinha, Eduardo Volotão, Nathália Lanzarini, vocês foram muito importantes durante este processo, sempre dispostos a colaborar nas atividades laboratoriais e compartilhar bons momentos juntos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

SUMÁRIO

Agradecimentos	v
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	x
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1- Introdução	15
1.1- Histórico	15
1.2- Genoma e Morfologia.....	17
1.3- Diversidade Genética e Mecanismos de Evolução dos Norovírus.....	21
1.4- Transmissão, Patogênese, Manifestações Clínicas e Resposta Imunológica das Infecções por Norovírus.....	25
1.5- Diagnóstico Laboratorial.....	28
1.6- Epidemiologia.....	30
1.6.1- Epidemiologia do Genótipo GII.17	32
1.7- Norovírus no Brasil.....	33
1.9- Vigilância, Prevenção e Controle	37
1.8.1- Vacinas	37
2- Relevância	39
3- Objetivos	41
3.1- Objetivo Geral	41
3.2- Objetivos Específicos.....	41
4- Resultados	42
4.1- Norovírus Recombinant strains isolated from gastroenteritis outbreaks in Southern Brazil, 2004-2011	43
4.2- Detection and molecular characterization of emergent GII.P17/GII.17 Norovirus in Brazil, 2015.....	56
4.3- Norovirus GII.17 Associated with a Foodborne Acute Gastroenteritis Outbreak in Brazil, 2016	62
4.4- Molecular analysis of complete nucleotide sequences of norovirus GIIP.17- GII.17 detected in Brazil.....	68
5- Discussão.....	89
5.1- Detecção e caracterização de norovírus recombinantes isolados de surtos de gastroenterite aguda na região sul do Brasil, no período de 2004 a 2011	89
5.2- Detecção e caracterização molecular de norovírus GII.P17-GII.17 Kawasaki_2014 emergente no Brasil, 2015.....	91
5.2-Detecção e caracterização molecular de norovírus GII.P17-GII.17 Kawasaki_2014 emergente no Brasil, 2015	
5.2.1- Estudo Filogenético (ORF-1), Análise de Relógio Molecular e Filogeografia de Isolados Brasileiros	91
5.2.2- Norovírus GII.17 associado a um surto de gastroenterite aguda de transmissão alimentar no Brasil, 2016	93
5.2.3- Caracterização molecular e análise filogenética do genoma completo de norovírus GII.P17-GII.17 Kawasaki_2014 detectados no Brasil	95
6- Conclusões	98
7- Perspectivas.....	99

8- Referências Bibliográficas.....	100
9- Anexos	120
9.1- Figura 1 do artigo 4	120
9.2- Figura 2 do artigo 4	121
9.3- Figura 3 do artigo 4	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Agregado de partículas do agente <i>Norwalk-like</i> vírus	16
Figura 2: Representação esquemática da organização genômica dos norovírus	17
Figura 3: Estrutura do capsídeo de uma partícula de <i>Norwalk-like</i> vírus.	20
Figura 4: Relação filogenética dos genótipos de norovírus com base na sequencia aminoacídica completa RNA polimerase RNA dependente (ORF-1) e da proteína de capsídeo VP1(ORF-2).....	24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

3CLpro – 3C-*like* Protease

aa – aminoácido

ABO – grupo A-B-O de histocompatibilidade

AGE- do inglês *Acute Gastroenteritis*

BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

bp – do inglês *base pairs*

CDC – do inglês *Center for Disease Control and Prevention*

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

DNA – ácido desoxirribonucléico

Domínio P – do inglês domínio Protruding

Domínio S – do inglês domínio Shell

ELISA – do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EIE – ensaios imunoenzimáticos

EUA – Estados Unidos da América

EPA – do inglês *Environmental Protection Agency*

FBE – do inglês *Food-Borne Viruses in Europe*

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

FUT – fucosil transferase

G – genogrupos de norovírus

GG – genótipos de norovírus

GA – gastroenterite aguda

HBGA – do inglês *Histo-Blood Group Antigens* (antígenos de histocompatibilidade)

IAHA- hemaglutinação por imunoaderência

ICTV – do inglês *International Committee for Taxonomy of Viruses*

IgA – imunoglobulina A

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IME – imunomicroscopia eletrônica

IL-2- Interleucina-2

INF- γ - Interferon Gama

IOC – Instituto Oswaldo Cruz
kb – kilobases
kDa – kilodaltons
LACEN – Laboratório Central de Saúde
LVCA – Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental
M – Molar
ME – microscopia eletrônica
MG – Minas Gerais
n - número
NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*
NLV – do inglês *Norwalk-like viruses*
NORS- do inglês *National Outbreak Report*
nm – nanômetro
NoV - norovírus
NSP3 - proteína não-estrutural de rotavírus NSP3
N-terminal – extremidade amino terminal
nt - nucleotídeos
NTPase – nucleosídeo trifosfato hidrolase
OMS - Organização Mundial de Saúde
ORF – do inglês *Open Reading Frame* (fase aberta de leitura)
P1 – do inglês subdomínio *Protruding 1*
P2 – do inglês subdomínio *Protruding 2*
p20 – proteína de 20KDa
p22 – proteína de 22 kDa
p40 - proteína de 40KDa
p48 – proteína de 48 kDa
pb – pares de bases
RT-PCR – reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa
pH – potencial hidrogeniônico
poli A ou (A)_n – cauda poliadenilada
p.p.m. – partes por milhão
qRT- PCR – reação em cadeia pela polimerase quantitativa precedida pela transcrição reversa
RdRp – RNA polimerase RNA dependente

RIE - Radioimunoensaio

RNA – ácido ribonucleico

RS – Rio Grande do Sul

RT – transcriptase reversa

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa

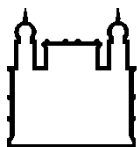
SRSV – do inglês *small round-structured virus*

UTR – do inglês *untranslate region*

VLP – do inglês *virus-like particle*

VP1 – proteína de capsídeo de norovírus VP1

VP2 – proteína de capsídeo de norovírus VP2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

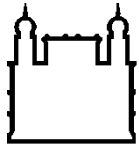
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**VIGILÂNCIA DOS NOROVÍRUS GII: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
RECOMBINANTES E DA VARIANTE EMERGENTE GII.P17-GII.17
KAWASAKI_2014 NO BRASIL**

Juliana da Silva Ribeiro de Andrade

RESUMO

Os norovírus são os principais agentes etiológicos causadores de surtos de gastroenterite aguda em todo o mundo, principalmente devido à grande diversidade genética, resultante da frequente emergência de recombinantes e novas variantes. Os norovírus pertencem à família *Caliciviridae* e ao gênero *Norovirus* que contém seis genogrupos (G), dos quais GI, GII e GIV infectam humanos, sendo GII de maior importância epidemiológica por sua capacidade evolutiva. Este estudo teve como objetivo realizar a vigilância dos norovírus GII em casos de gastroenterite aguda ocorridos no Brasil no período de 2004 a 2016, pela caracterização molecular de recombinantes e variantes emergentes. Com esta finalidade, amostras fecais provenientes de surtos e casos esporádicos foram submetidas à detecção de norovírus GII por PCR quantitativo utilizando iniciadores e sonda específicos, com posterior sequenciamento nucleotídico. Pela análise da região da junção ORF-1/ORF-2 foram descritas oito recombinantes (GII.P7/GII.6; GIIP.g/GII.12; GII.P16/GII.3; GII.Pe/GII.17; GII.P7/GII.14; GII.P13/GII.17; GII.P21/GII.3 e GII.P21/GII.13) circulando em casos de surtos de gastroenterite aguda ocorridos na região sul do país. Pelo sequenciamento completo da ORF-2 foi detectada, pela primeira vez no Brasil, a nova variante emergente GII.P17-GII.17 Kawasaki_2014, com estimativa de data de introdução no ano de 2014, sendo Hong Kong a principal fonte da entrada desses vírus no país. Posteriormente, esta nova variante foi detectada em um surto de gastroenterite aguda de origem alimentar ocorrido na região sudeste. Pelo sequenciamento completo do genoma de doze isolados brasileiros desta variante emergente, demonstrou-se que a linhagem brasileira pertence ao subcluster C-II, que corresponde à linhagem epidêmica circulante na Ásia. A caracterização de diferentes recombinantes, assim como a detecção de uma variante emergente, demonstra a rápida evolução e dispersão desses vírus enfatizando a importância da vigilância contínua no país, principalmente devido ao impacto da introdução de novos vírus em uma população susceptível.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

SURVEILLANCE OF NOROVIRUS GII: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF RECOMBINANTS AND THE EMERGING GII.P17-GII.17 KAWASAKI_2014 VARIANT IN BRAZIL

Juliana da Silva Ribeiro de Andrade

ABSTRACT

Noroviruses are considered the major etiological agents causing acute gastroenteritis worldwide, mainly due to the wide genetic variety resulting from the emergence of recombinants and new variants. Noroviruses belong to the family *Caliciviridae* and to the *Norovirus* genus, which contains six genogroups (G), of which GI, GII and GIV infect humans, with GII having the major epidemiological importance due to its evolutionary ability. In this context, the objective of this study was to carry out epidemiological surveillance of GII norovirus in cases of acute gastroenteritis in Brazil from 2004 to 2016, by the molecular characterization of recombinant and emerging variants. For this purpose, fecal samples from outbreaks and sporadic cases were submitted to the detection of norovirus GII by quantitative PCR using specific primers and probe, with subsequent nucleotide sequencing for molecular characterization of the detected samples. By the analysis of the ORF-1 / ORF-2 junction region, were described eight non-GII.4 norovirus recombinants (GII.P7/GII.6; GIIP.g/GII.12; GII.P16/GII.3; GII.Pe/GII.17; GII.P7/GII.14; GII.P13/GII.17; GII.P21/GII.3 and GII.P21/GII.13), circulating in outbreak cases of acute gastroenteritis occurred in the southern region of the country. Characterized for the first time in Brazil, the new variant GII.P17-GII.17 Kawasaki_2014, was detected by the complete sequencing of ORF-2, with estimated date of introduction in 2014, with Hong Kong being the most probable source of introduction of these viruses in the country. Posteriorly, the new variant was detected in an outbreak of foodborne acute gastroenteritis in the southeastern region of Brazil. The full genome sequencing of twelve Brazilian isolates of the emerging variant demonstrated that the Brazilian lineage was grouped with the most recently isolated samples from Asia, belonging to the C-II subcluster, evidencing the rapid evolution and genetic diversification of these viruses, emphasizing the importance of continuous surveillance of noroviruses in Brazil, mainly due to the introducing of new viruses among the susceptible population.

1- Introdução

1.1- Histórico

Os norovírus foram os primeiros vírus descritos como agente etiológico em casos de gastroenterite aguda (GA), detectados por imunomicroscopia eletrônica (IME). No ano de 1968, um surto de GA que ocorreu em uma escola elementar em Norwalk, Ohio nos Estados Unidos acometeu cerca de 50% dos alunos e professores da escola. A doença caracterizada por vômito, diarreia, náuseas e dores abdominais era semelhante à doença descrita em 1929 (Zahorsky, 1929), denominada “*winter vomiting disease*”. A investigação do agente etiológico levou à conclusão de que não era uma doença bacteriana e sim causada por um agente viral, porém tentativas de propagação em cultivo celular não foram bem-sucedidas (Adler & Zickl, 1969). Mais tarde, estudos com filtrados de material de voluntários infectados, revelaram que o agente “Norwalk” se tratava de uma partícula com menos de 36 nanômetros (nm) de diâmetro e que não propagava em cultivo celular, assim como em inoculo em animais (Dolin et al., 1971, 1972).

Somente no ano de 1972, Kapikian e colaboradores (1972), pelos métodos de precipitação de partículas virais e imunomicroscopia eletrônica, conseguiram visualizar agregados de partículas de 27 nm (Figura 1) provenientes de fezes de indivíduos infectados voluntariamente com filtrados das fezes de pacientes do surto de GA de Norwalk, sendo então denominados “*Norwalk-like*” vírus.

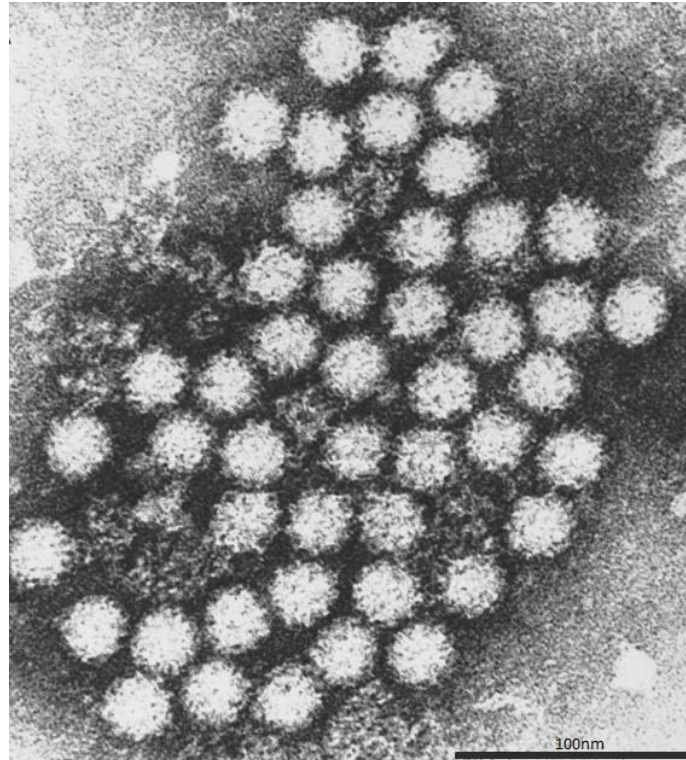


Figura 1: Agregado de partículas do agente *Norwalk-like* vírus (27 nm de diâmetro) encontrado em filtrados de fezes por imunomicroscopia eletrônica. Adaptado de Kapikian e colaboradores (1972).

Os norovírus foram classificados de acordo com a morfologia característica dos calicivirus, observada por Madeley e Cosgrove (1976) e denominados *Small Round Structured Viruses* (SRSV). Após vários surtos de GA associados aos SRSV, esses vírus foram identificados como os patógenos causadores da doença intestinal humana (Chiba et al., 1979; Cubitti et al., 1979). Alguns anos depois, Greenberg e colaboradores (1981) isolaram e identificaram uma proteína estrutural de 59 kDa do agente *Norwalk*, sugerindo que pertenciam à família *Caliciviridae*.

A família *Caliciviridae* foi criada pelo III Comitê Internacional de Taxonomia (ICTV) no ano de 1979 (Matthews et al., 1979). Seu nome é derivado da palavra em latim *cálix*, em virtude de a estrutura desses vírus apresentar depressões semelhantes a um cálice, visualizadas por toda a superfície do capsídeo viral.

A partir de 1988, o ICTV determinou que a classificação dos calicivírus seria feita pela relação filogenética, em que as distâncias genéticas definiriam os diferentes grupos. Desta forma, atualmente a família *Caliciviridae* é

constituída por cinco gêneros: *Vesivirus*, *Lagovirus*; *Norovirus* com protótipo Norwalk virus; *Nebovirus* e *Sapovirus* (Clarke et al., 2011).

O desenvolvimento das técnicas moleculares permitiu que o genoma completo dos *Norwalk-like* vírus fosse sequenciado, fornecendo informações que corroboraram a inclusão desses vírus na família *Caliciviridae* (Jiang et al., 1990; Ando et al., 1994; Hardy & Estes, 1996; Atmar & Estes, 2001).

1.2- Genoma e morfologia

O genoma dos norovírus é constituído por um RNA de fita simples, de polaridade positiva e aproximadamente 7,7 Kb organizado em três fases abertas de leitura - ORFs 1, 2 e 3 (do inglês *Open Reading Frame*). Uma região não traduzida (UTR- do inglês *Untranslate Region*) é encontrada em cada uma das extremidades 3' e 5' e uma cauda poli (A) na extremidade 3' do genoma viral. Observa-se também um RNA subgenômico de aproximadamente 2,3 Kb contendo as ORFs 2 e 3 e uma UTR em sua extremidade 3' (Figura 2) (Hardy & Estes, 1996; Green et al., 2013).

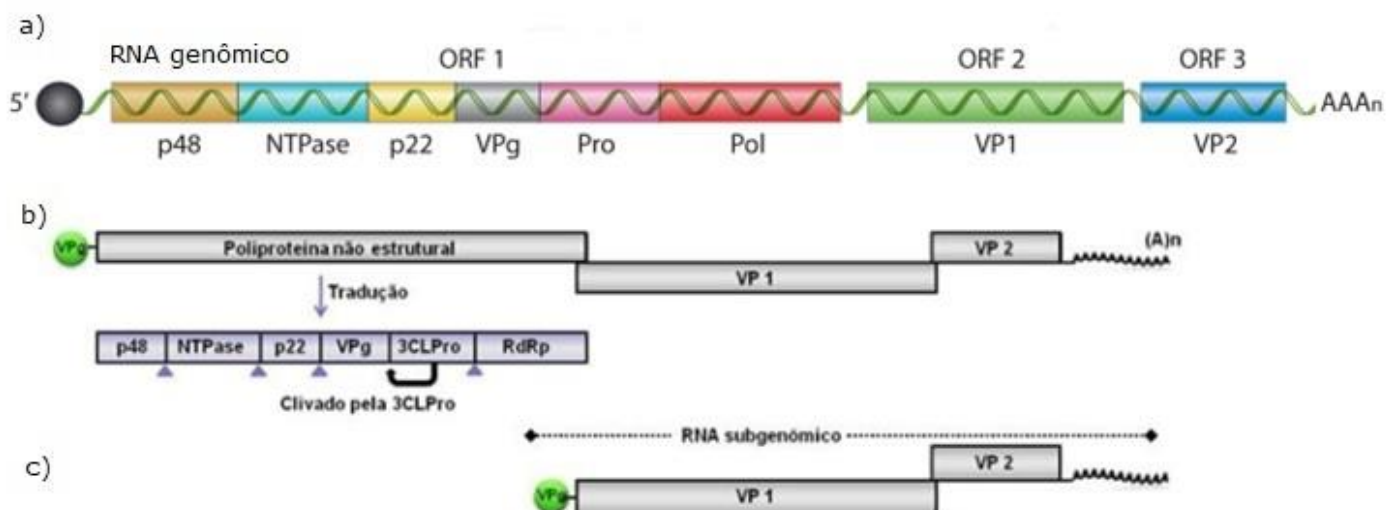


Figura 2: Representação esquemática da organização genômica dos norovírus. a) Representação das ORF1, ORF2 e ORF3. b) ORF 1-poliproteína não estrutural

composta pelos domínios p48: proteína amino-terminal; NTP: proteína nucleosídeo trifosfatase (NTPase); p22: proteína p22; VPg: proteína viral de ligação ao genoma; 3C: protease 3C-like (3CL^{pro}); RdRp: RNA polimerase RNA dependente; ORF2 - VP1: proteína principal do capsídeo; S, P1, P2: subdomínios da proteína VP1; ORF3- VP2: proteína menor do capsídeo; AAAn: Cauda Poli (A); RNA subgenômico contendo os genes que codificam as proteínas virais do capsídeo. c) representação do RNA subgenômico contendo as ORFs 2 e 3. Adaptado de Donaldson (2008) e Robilotti (2015).

A ORF 1 representa cerca de 65% do genoma viral, com aproximadamente 5 Kb codifica a poliproteína não estrutural de 193 a 200 kDa. Essa poliproteína é processada proteolicamente originando as proteínas p48, p40, p22 (ou p20, depende do genogrupo), VPg, 3CL^{pro} e a RNA polimerase RNA dependente (RpRd). As ORF2 e ORF3 localizadas na extremidade 3' do genoma, codificam as proteínas estruturais do capsídeo viral VP1 (58-60 kDa) e VP2 (208-268 kDa), respectivamente. Na extremidade 5' do RNA genômico e subgenômico se encontra unida, covalentemente, a proteína VPg. Esta proteína de 15 kDa atua, provavelmente, na síntese de novas moléculas de RNA viral (Jiang et al., 1993; Nilsson et al., 2003; Hardy, 2005; Karst, 2010). A RpRd atua não só na replicação viral como também gera VPg uridilada, e se estende do aminoácido 1281 até o carboxi-terminal da ORF-1, apresentando elementos estruturais e catalíticos similares a RpRd de todos os vírus de RNA de polaridade positiva. As outras proteínas não-estruturais também estão associadas a maquinaria de replicação viral: a p48 é uma proteína N-terminal que regula o transporte de vesículas e inibe a expressão de proteínas de superfície da célula hospedeira, regula a proliferação celular, além de fornecer suporte para a maquinaria de replicação; a p40 tem função de nucleosídeo trifosfatase (NTPase); a p22 (ou p20, depende do genogrupo) inibe a secreção de proteínas da célula hospedeira; a VPg é uma proteína que pode atuar como um iniciador da replicação viral após sua uridilização e atua ainda na interação com os fatores de tradução celular, mediando a interação do RNA viral e a maquinaria de tradução da célula; a 3CL^{pro} que está envolvida na clivagem da poliproteína codificada pela ORF1 (Hardy, 2005).

A partícula viral é não-envelopada, esférica e possui simetria icosaédrica, medindo de 26 a 37 nm de diâmetro. O capsídeo é formado por algumas cópias da proteína VP2 e por dímeros da proteína VP1 organizados

em 90 capsômeros que formam 32 depressões em sua superfície (Prasad et al., 1999; Hardy, 2005).

A proteína estrutural VP1 é a maior proteína estrutural que compõe o capsídeo viral, contendo aproximadamente 530-555 aminoácidos (aa) com peso molecular entre 58-60 kDa. Possui dois domínios conservados que flanqueiam um domínio central variável que contém sítios antigênicos específicos de cada cepa viral. A VP1 se divide em dois domínios principais S (*shell*) e P (*protruding*), unidos por uma dobradiça. Os 225 aminoácidos localizados na porção N-terminal constituem o domínio S, contendo elementos que atuam na formação do capsídeo de simetria icosaédrica. O domínio P abrange todos os outros aminoácidos se estendendo do aa 225 ao 530. Os domínios P interagem em dímeros, o que aumenta a estabilidade do capsídeo e forma as protrusões visualizadas no vírion ao ME. Se subdivide em dois subdomínios P1 e P2, em que o subdomínio P2 é uma inserção de 127 aa no subdomínio P1 e fica localizado do aa 279-405 (considerando-se o *Norwalk-virus* como referência). Desta forma, o subdomínio P1 compreende as regiões localizadas entre os aa 225-279 e 405-530 (Figura 3). A região do subdomínio P2 é hipervariável e desempenha papel importante na ligação do vírus com o receptor celular e na antigenicidade viral. Além disso, está associada com a interação do vírus com o sistema histo-sanguíneo ABO (HBGA), relacionado à susceptibilidade à infecção por norovírus.

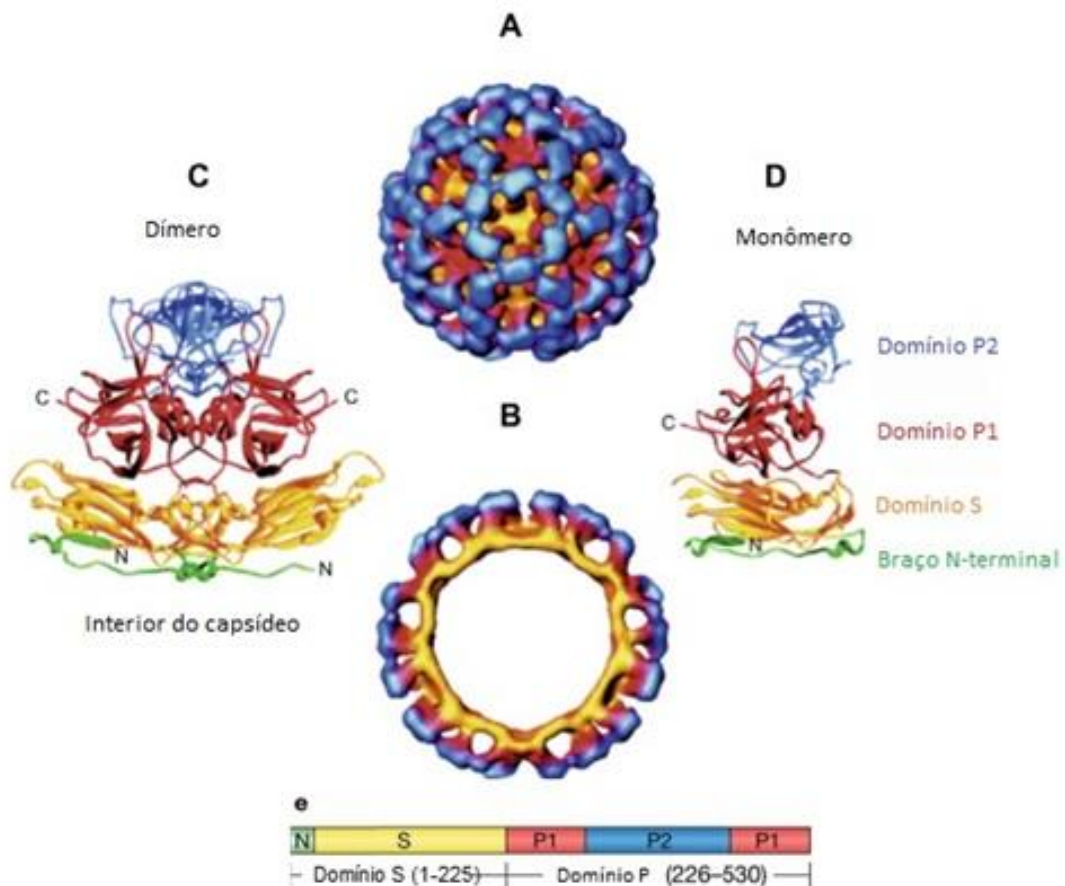


Figura 3: Estrutura do capsídeo de uma partícula de *Norwalk-like* vírus. (A) Representação da superfície do capsídeo viral; (B) corte transversal do capsídeo; (C) Dímero da proteína VP1 do capsídeo viral. Noventa dímeros formam a proteína VP1 inteira; (D) Monômero da proteína VP1 do capsídeo viral. Cada monômero é dividido em domínios (S e P) e subdomínios (P1 e P2); (E) representação das posições dos domínios S, P1, P2 da VP1 na ORF2. Adaptado de Tan & Jiang (2007) e Scipioni (2008).

A proteína VP2 é a menor proteína estrutural do capsídeo viral, encontrada em uma ou duas cópias por vírion é essencial na síntese de partículas infecciosas. Tem aproximadamente 208-268 aa, com peso molecular de cerca de 22-29 kDa, apresentando grande variabilidade entre as diferentes cepas de norovírus. A região entre os aa 108 e 152 compreende o domínio de interação com a proteína VP1 o que está relacionado com a estabilização dos dímeros de VP1 e à resistência à degradação por proteases. A proteína VP2 atua ainda na encapsidação do genoma viral e estabilização do RNA mensageiro da ORF-2, regulando os níveis de expressão da VP1 (Prasad et al., 1999; Bertolotti-Ciarlet et al., 2003; Hardy, 2005; Tan & Jiang, 2005).

1.3- Diversidade genética e mecanismos de evolução dos norovírus

Devido a grande diversidade genética, os norovírus são divididos em genogrupos (G) e genótipos (GG) baseado em um sistema de classificação filogenética, que utiliza o método de distância sem correção da sequência aminoacídica completa da proteína VP1 (ORF-2) (Zheng et al., 2006).

Norovírus do mesmo genogrupo devem apresentar distância entre 45-61,4% na sequência aminoacídica completa da ORF2, e vírus com distância entre 14,3-43,8% são agrupados em diferentes GG e de 0-14,1% agrupados em diferentes estirpes. De acordo com este sistema os norovírus são divididos em seis genogrupos (GI-GVI), sendo o sétimo proposto por Vinjé (2015), baseado na reclassificação de genótipos caninos GIV, em um genogrupo separado (Zheng et al., 2006; Vinjé, 2015).

Somente os norovírus dos genogrupos GI, GII e GIV são capazes de infectar humanos e, até o momento, foram classificados nove genótipos do GI, 22 genótipos de GII e um genótipo de GIV (Figura 4), sendo o GII de maior impacto epidemiológico (Kronneman et al., 2013).

Os norovírus animais são classificados em diferentes genogrupos, sendo três genótipos pertencentes ao genogrupo GII (GII.11, GII.18, and GII.19) detectados unicamente em suínos. O genogrupo GIII inclui os genótipos que infectam ovinos e bovinos, enquanto que os norovírus GIV consistem de dois genótipos, dos quais o GIV.2 tem sido detectado em felinos e caninos. Os norovírus murinos estão compreendidos no genogrupo GV, o genogrupo GVI inclui vírus caninos e felinos e o GVII exclusivamente norovírus caninos (Green et al., 2013; Vinjé et al., 2015; de Graaf et al., 2017). Recentemente, alguns grupos de pesquisa descreveram a detecção de norovírus em morcegos, sendo geneticamente relacionados aos genogrupos GIV e GV (Hu et al., 2017; Kocher et al., 2018).

Apesar da grande diversidade dos norovírus, durante décadas, o genótipo GII.4 foi descrito como o prevalente em humanos em todo o mundo (Green et al., 2002; Siebenga et al., 2009; Vinjé, 2015; Parra et al., 2017). Desde meados da década de 90, seis epidemias globais foram associadas a

emergência de seis novas variantes pandêmicas deste genótipo (Siebenga et al., 2009; Vinjé, 2015; Parra et al., 2017).

Em 2010, foi proposta uma nova classificação, que caracteriza diferentes variantes quando a diferença aminoacídica de sequências completas da ORF-2 for superior a 5%. (Zheng et al., 2010). De acordo com a nomenclatura proposta, as variantes dos norovírus devem ser nomeadas com o local de origem da primeira sequência completa da ORF-1 e o ano de detecção. Obedecendo esta norma, até o momento, oito variantes epidêmicas dos norovírus GII.4 foram nomeadas como: US95_96 (1995-2002); Farmington Hills_2002 (2002-2004), Asia_2003 (2003-2006), Hunter_2004 (2004-2006), Yerseke_2006^a (2006-2008), Den Haag_2006b (2006-2012), New Orleans_2009 (2008-2012), Sydney_2012 (Kronneman et al., 2013).

Dois principais mecanismos de diversificação genética conduzem a evolução dos norovírus: as mutações pontuais e os eventos de recombinação. Devido à característica intrínseca à RpRd de não realizar a função de *proofreading* durante a replicação viral, a taxa de mutação dos norovírus é maior quando comparado a vírus com genoma DNA (Zheng et al., 2010). O mecanismo de mutações pontuais está relacionado à rápida capacidade evolutiva e diversificação genética dos norovírus, associadas à frequente emergência de novas variantes desses vírus (Lindesmith et al., 2012; White, 2014). O acúmulo de mutações principalmente no subdomínio P2 da proteína VP1, região hipervariável do genoma, origina alterações nos sítios antigênicos e de ligação aos receptores celulares, com implicações diretas na susceptibilidade do hospedeiro às infecções por norovírus (Lindesmith et al., 2012; White, 2014).

A recombinação constitui mais um importante mecanismo de emergência de novas variantes de norovírus (Bull et al., 2012). Demonstrou-se que recombinantes de norovírus são gerados a partir da capacidade que a RdRp tem de trocar de fita molde para outra durante a replicação viral em uma célula co-infectada (Green, 2013). A região de junção entre as ORFs1 e 2 é o principal ponto de recombinação de genoma dos norovírus, que pode ocorrer entre vírus do mesmo genótipo ou de genótipos diferentes (White et al., 2014) contudo, recombinação entre as ORFs 2-3 também podem ocorrer, com menor frequência (Bull et al, 2005; Eden et al., 2013). O aumento da diversidade

genética através da recombinação está relacionado à interação de uma nova RpRd com as proteínas de capsídeo VP1 e VP2, alterando positivamente a eficiência na replicação viral (de Graaf et al., 2016). O sequenciamento parcial da região da junção entre as ORFs 1 e 2 tem permitido a detecção dos norovírus recombinantes (Vinjé & Koopmans, 1996; Anderson, et al., 2001; Vennema et al., 2002; de Graaf et al., 2016).

Com a crescente detecção de recombinantes de norovírus GI e GII, Kronneman e colaboradores (2013) propuseram um sistema de nomenclatura para recombinantes, que inclui o genótipo da polimerase e o da VP1, como por exemplo: GII.P16-GII.4. Baseado no sequenciamento completo da ORF-1, até o momento foram descritos pelo menos 14 tipos de polimerase GI (GI.P) e 27 tipos de polimerase GII (GII.P) (Figura 4) (Vinjé, 2015).

1.4- Transmissão, patogênese, manifestações clínicas e resposta imunológica das infecções por norovírus

Os norovírus são vírus altamente infecciosos e de fácil transmissão em virtude de fatores, tais como: baixa dose infecciosa (18 a 103 partículas virais), eliminação de grande concentração de partículas virais (10^5 a 10^{11} partículas virais/grama de fezes) por indivíduos infectados e a resistência à exposição ao meio ambiente (Atmar et al., 2008; Teunis et al., 2008; Lopman et al., 2012).

São transmitidos pela rota fecal-oral, pelo contato pessoa-pessoa, através de aerossóis de vômito, água e alimentos contaminados. A transmissão pessoa-pessoa tem sido descrita como a principal forma de transmissão tanto em casos de surto quanto em casos esporádicos (Phillips et al., 2010; Verhoef et al., 2010; Lopman et al., 2012). Surtos de GA causados por norovírus são frequentemente descritos em ambientes confinados e com grande aglomeração de pessoas, como navios de cruzeiros (Morillo et al., 2017; Mouchtouri et al., 2017), universidades (CDC, 2009, Huang et al., 2017), escolas (Wang et al., 2018), hospitais (Kanamori et al., 2018), creches (Ferreira et al., 2012; Phumpholsup et al., 2015), asilos (Park et al., 2018), acampamentos militares (Sanchez et al., 2017) e resorts (Domènech-Sánchez et al., 2009; Arvelo et al., 2012). Em ambientes confinados, a transmissão é facilitada pelos inúmeros episódios de vômito associados aos indivíduos infectados por norovírus, gerando aerossóis que constituem uma importante via de transmissão (Lopman 2011; Thornley et al., 2011, Godoy et al., 2016).

O período de incubação nas infecções por norovírus pode variar de 24 a 48 horas, com resolução dos sintomas de 12 a 72 horas, podendo durar até 6 dias (Estes et al., 2006; Glass et al., 2009; Karst, 2010). As principais manifestações clínicas, que são vômito e diarreia, podem estar acompanhadas por náusea, dor abdominal, cefaleia, febre e mialgia (Rockx et al., 2002; Atmar et al., 2008; Karst, 2010). Entretanto, a taxa de indivíduos assintomáticos pode variar de 7 a 30%, o que representa uma importante fonte de infecção (García et al., 2006; Atmar et al., 2008; Ferreira et al., 2008, Huynen et al., 2013, Ahmed et al., 2014).

A susceptibilidade aos norovírus é heterogênea entre os humanos, pois nem todos os indivíduos são igualmente susceptíveis, assim como a patogenicidade difere entre os genótipos (Lindesmith et al., 2003; Thorven et

al., 2005). Alguns fatores estão relacionados com a patogênese e susceptibilidade aos norovírus, dentre elas a ligação do vírus com os antígenos histo-sanguíneos HBGA, o tropismo celular tecidual dependente do genótipo, a microbiota e a resposta imune do hospedeiro (de Graaf et al., 2016).

HBGAs são carboidratos glicanos expressos nas superfícies celulares de eritrócitos e células epiteliais da mucosa e determinam o tipo sanguíneo ABO e o grupo do sistema Lewis, sendo encontrados na saliva e outras secreções corporais humanas (Le Pendu et al., 2006; Currier et al., 2015). A especificidade da ligação da proteína VP1 com o HBGA depende do genogrupo e genótipo do vírus, o que resulta em diferenças na susceptibilidade do indivíduo a genótipos específicos de norovírus (Lindesmith et al., 2003).

Estudos recentes demonstram que a presença de bactérias da microbiota do hospedeiro pode influenciar na infecção por norovírus por vários mecanismos diferentes, atuando como antagonistas ou potencializadores da infecção viral. Dentre esses mecanismos, as bactérias podem atuar provendo HBGAs adicionais para a ligação dos norovírus, influenciando a expressão de HBGAs na mucosa intestinal e também modulando a imunidade do hospedeiro (Baldrige et al., 2015; de Graaf et al., 2016; Monedero et al., 2018).

A infecção por norovírus ocorre no intestino delgado, entretanto o tropismo pelo tipo celular específico não é bem definido, tendo em vista experimentos com VLPs (do inglês *Virus-Like Particles*) demonstraram que diferentes genótipos possuem diferentes tropismos celulares (de Graaf et al., 2016). Em biópsias de pacientes infectados, observa-se um achatamento rápido e reversível das vilosidades assim como o encurtamento das microvilosidades, o aumento do número de células epiteliais apoptóticas no lúmen da superfície duodenal e o aumento de linfócitos intraepiteliais, o que acarreta em lesões na mucosa intestinal (Troeger et al., 2009; Schwartz et al., 2011). O conjunto dessas alterações juntamente com a diminuição de proteínas das *tight-junctions* do epitélio, acarreta na disfunção da barreira epitelial permitindo o fluxo de água e íons dos capilares subepiteliais para o lúmen intestinal, provocando diarreia (Troeger et al., 2009).

A náusea e o início agudo de vômito nas primeiras 24 horas de infecção foram associadas ao atraso no esvaziamento gástrico e ao dano nas vilosidades intestinais (Meeroff et al., 1980). Eventualmente, as infecções por

norovírus podem levar ao óbito pacientes subnutridos e com desidratação grave, acometendo principalmente crianças menores de cinco anos e idosos maiores de 65 anos de idade (Mattner et al., 2006; Harris et al., 2008). A eliminação viral pode ocorrer no período de quatro a oito semanas em indivíduos adultos infectados e a detecção viral por RT-PCR pode ocorrer até 3 semanas após o início dos sintomas (Cheesbrough et al., 1997; Rockx et al., 2002; Atmar et al., 2008). Em pacientes imunocomprometidos esse período pode durar meses ou até mesmo anos (Gallimore et al., 2004; Simon et al., 2006; Frange et al., 2012). A eliminação viral de forma crônica, em pacientes imunocomprometidos ou não, aumentam a diversidade viral intra-hospedeiro além de elevarem os riscos de transmissão e contaminações nosocomiais (Sukhrie et al., 2010; Wingfield et al., 2010; Bull et al., 2012).

Infecções por norovírus levam à produção de IgM com pico de concentração duas semanas após a infecção, porém não é um indicativo de infecção primária tendo em vista sua detecção em infecções secundárias (Scipioni et al., 2008). A produção de IgG e IgA vírus específicos ocorre uma semana após a infecção, com pico de concentração de linfócitos B de memória duas semanas depois. Estudos demonstraram que a IgM possui curta duração, assim como a IgA, enquanto que a IgG persiste por meses, até anos após a infecção (Graham et al., 1994; Brinker et al., 1999; Lindesmith et al., 2005). IgA e IgG preexistentes no soro, assim como altas concentrações de linfócitos B de memória, foram relacionados com a proteção contra GA e diminuição da gravidade da doença (Swanstrom et al., 2014). Anticorpos séricos da classe IgG contra norovírus são genogrupo-específicos, embora seja observada reatividade cruzada intergenótipos pelo cruzamento da resposta contra estirpes heterólogas dentro do mesmo genótipo (Rockx et al., 2005; Cannon et al., 2009; Reeck et al., 2010; Lindesmith et al., 2010, 2011). Anticorpos maternos foram associados à proteção de crianças contra infecções por norovírus, que depois passam a produzir anticorpos com capacidade protetora (Ramani et al., 2015). Foi evidenciado ainda que há um aumento significativo de interferon gama (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2), aumentando a ativação de macrófagos e anticorpos da classe IgG que favorecem a opsonização (Lindesmith et al., 2005).

1.5- Diagnóstico Laboratorial

A IME (imuno microscopia eletrônica) e a microscopia eletrônica direta foram as primeiras técnicas utilizadas na detecção dos norovírus. Entretanto, tratam-se de técnicas custosas e de baixa sensibilidade (10^6 partículas virais/grama de fezes) que, associados a vasta diversidade dos norovírus e a dificuldade de se obter anticorpos específicos, não são aplicáveis no diagnóstico de rotina ou estudos epidemiológicos (Atmar & Estes, 2001).

Para aplicação em estudos de soroprevalência, técnicas imunológicas foram desenvolvidas como alternativa à IME como a técnica hemaglutinação por imunoaderência (IAHA), radiomunoensaio (RIE) e ensaios imunoenzimáticos (EIE), que permitiam detectar antígenos e anticorpos anti-norovírus. Contudo, por não serem propagáveis em cultivos celulares, a produção de anticorpos para norovírus sempre foi um obstáculo no desenvolvimento de técnicas imunológicas (Greenberg & Kapikian, 1978; Kapikian et al., 1978; Atmar & Estes, 2001).

Após a caracterização molecular do genoma dos norovírus, Jiang e colaboradores (1992) clonaram o genoma desses vírus e desenvolveram um sistema de expressão da proteína de capsídeo VP1, utilizando baculovírus como vetor de expressão, gerando VLPs, constituídas por um capsídeo morfológica e antigenicamente similar as partículas virais, porém sem a presença do genoma viral em seu interior (Jiang et al., 1992). As VLPs possibilitaram a produção de anticorpos poli e monoclonais pela imunização de diferentes animais, assim como também podiam ser utilizadas como antígenos em testes imunoenzimáticos de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). As VLPs tornaram os testes de ELISA mais sensíveis e mais específicos, tendo em vista que não apresentavam reatividade cruzada com outros vírus gastroentéricos. Ainda assim, o uso da técnica continuou limitado devido à grande diversidade antigênica dos norovírus, pois o uso de diferentes VLPs simultaneamente acarretam resultados falso negativos (Lopman et al., 2002). Embora sua sensibilidade seja questionável e não possa identificar os genótipos dos norovírus, em casos de surtos, os ensaios imunoenzimáticos ainda podem ser utilizados como teste de triagem,

combinados com outros testes mais sensíveis e específicos como os testes moleculares, podem fornecer resultados mais rápidos e reduzir os custos laboratoriais (Jiang et al., 1992, 1993, 2000; Atmar et al., 2001; Lopman et al., 2002; Richards et al., 2003; Vinjé, 2015).

Atualmente, as técnicas moleculares são amplamente utilizadas no diagnóstico e caracterização dos norovírus por apresentarem maior sensibilidade e especificidade. Na década de 90, foi desenvolvida uma RT-PCR qualitativo ou convencional, tendo como alvo uma pequena região conservada no gene da RpRd, localizada na extremidade 3' da ORF-1 (regiões A e B) (Vinjé et al., 1996, Beuret et al., 2002, Boxman et al., 2006, La Rosa et al., 2007). Entretanto, o uso dessa região não permitia a genotipagem, sendo utilizada somente para detecção dos norovírus.

Com a disponibilidade de sequências genômicas dos norovírus em banco de dados públicos, novas técnicas foram desenvolvidas para regiões mais variáveis do genoma viral, tendo em vista a necessidade de genotipagem dos vírus circulantes. Com esta finalidade, iniciadores desenhados para as diferentes regiões da proteína VP1, permitiam a genotipagem através das sequências amplificadas, já que o gene completo da ORF-2 é utilizado como padrão para a caracterização molecular e estudos filogenéticos dos norovírus (Zheng et al., 2006; Vinje, 2015). Iniciadores desenvolvidos para as extremidades 5' (regiões C e E) e 3' da ORF2 (região D) se mostraram sensíveis e específicos, permitindo a caracterização molecular dos norovírus em genogrupo e em genótipos (Noel et al., 1997; Kojima et al., 2002; Vennema et al., 2002; Vinjé et al., 2004).

A RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) apresenta maior sensibilidade e especificidade quando comparada à RT-PCR convencional. É uma técnica molecular mais vantajosa que utiliza iniciadores e sondas específicas, reduzindo manipulação do produto de PCR, dispensado o uso de gel de agarose, diminuindo o risco de contaminação assim como o tempo e custos dispendidos na técnica, além de permitir a quantificação das partículas virais (Kageyama et al., 2003). Inicialmente, a qRT-PCR foi desenvolvida para a detecção dos norovírus GI e GII separadamente, tendo como alvo a região de junção entre as ORFs 1 e 2, que é considerada a região mais conservada do genoma viral (Kageyama et al., 2003). No entanto, novos protocolos foram

desenvolvidos, permitindo a detecção e quantificação simultânea dos norovírus GI e GII em uma reação duplex, diminuindo o tempo e custo do ensaio (Pang et al., 2005; Rolfe et al., 2007; Wolf et al., 2007; Vega et al., 2011). Entretanto, a sensibilidade desses testes é menor quando comparada ao ensaio monoplex (Schultz et al., 2011).

Nos últimos anos, a técnica de qRT-PCR tem sido utilizada em todas as partes do mundo como padrão ouro para uma detecção rápida e sensível dos norovírus em amostras clínicas de fezes, vômito e sangue, bem como em amostras de alimentos, água e ambiente (Vinjé, 2015). Atualmente, grande parte dos laboratórios têm utilizado a técnica de *One-step* qRT-PCR, em que a transcrição reversa e a amplificação do DNA complementar (cDNA) são realizadas em uma só reação, reduzindo a manipulação das amostras, tornando o ensaio ainda mais rápido e com menor risco de contaminação.

O sequenciamento nucleotídico das ORFs 1 e 2 tem sido de grande importância na detecção e caracterização dos norovírus recombinantes, utilizando a combinação de iniciadores que tem como alvo a região de junção destas regiões (Vinje & Koopmans, 1996; Beuret et al., 2002; Kojima et al., 2002).

Grandes avanços nos estudos de evolução genética e antigêncica dos norovírus têm sido obtidos pelo sequenciamento do genoma completo. Protocolos que permitem a amplificação das ORFs 1, 2 e 3 de diferentes genótipos foram descritos, auxiliando na investigação da relação genética de cepas emergentes com outros vírus (Xue et al., 2016; Matsushima et al., 2016)

1.6- Epidemiologia

Os norovírus são os principais agentes causadores de surtos e casos esporádicos de GA não-bacteriana, acometendo indivíduos de todas as faixas etárias, disseminado globalmente. Estimativas indicam que as infecções por norovírus ocasionam 70.000 a 200.000 mortes anualmente em todo o mundo e que sua prevalência em casos de GA é de cerca de 18%, associados a 14% das hospitalizações de crianças menores de 5 anos de idade (Patel et al., 2008; Ahmed et al., 2014). Apesar disso, GA grave é descrita com maior frequência em adultos maiores que 65 anos de idade, que contabilizam o maior

número de casos de morte causadas por norovírus (Hall et al., 2011; Ahmed et al., 2014). Somente nos Estados Unidos, estima-se que os norovírus causem de 570 a 800 mortes, 56.000-71.000 hospitalizações, 400.000 atendimentos emergenciais e 1.9 milhões de atendimentos ambulatoriais por ano (Hall et al., 2013). O número de hospitalizações em países em desenvolvimento chega a um milhão de casos e o número de mortes em crianças menores de cinco anos alcança 200.000 todo ano (Patel, et al., 2008; Ahmed et al., 2014).

O padrão de sazonalidade das infecções por norovírus ainda não é bem estabelecido, ocorrendo casos de GA causada por esses vírus praticamente o ano inteiro. Apesar disso, em países de clima temperado picos de detecção dos norovírus têm sido identificados com maior frequência no inverno e em períodos secos (Iritani et al., 2002; Hasman et al., 2004; Fretz et al., 2005; Patel et al., 2009; Matthews et al., 2012; Chan et al., 2015). No Brasil, não há um padrão de sazonalidade definido (Borges et al., 2006; Soares et al., 2007; Victoria et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Ferreira et al., 2010a, 2010b; Georgiadis et al., 2010, Andrade et al., 2014).

Dados das redes colaborativas internacionais de vigilância dos norovírus, CaliciNet e NoroNet, demonstraram que a forma de transmissão dos norovírus pode estar relacionada com as diferentes cepas desses vírus. O genótipo GII.4 prevalente durante décadas, está associado frequentemente à transmissão por contato pessoa-pessoa, enquanto que genótipos como GI.3, GI.6, GI.7, GII.3, GII.6 e GII.12, estão mais frequentemente associados à transmissão alimentar (Verhoef et al., 2015; de Graaf et al., 2016). Genótipos do genogrupo GI são relacionados com grande frequência à transmissão através da água, o que pode estar associado à maior estabilidade dos norovírus GI na água quando comparados aos norovírus GII (Lysen et al., 2009; de Graaf et al., 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que os norovírus sejam a principal causa de surtos de GA de transmissão alimentar, causando 125 milhões de casos em todo o mundo (Kirk et al., 2015). Somente nos Estados Unidos, estima-se que ocorram cerca de 21 milhões de casos de GA causadas por norovírus por ano e cerca de um quarto dos mesmos são atribuídos a transmissão alimentar (CDC, 2011; Scallan et al., 2011).

Desde meados da década de 90, os norovírus GII.4 têm sido associados a maioria dos casos de surtos e casos esporádicos de GA em todo o mundo (Siebenga et al., 2009, Cannon et al., 2017). Epidemias e pandemias associadas a este genótipo, somam mais de 80% das infecções por norovírus nas últimas décadas (Siebenga et al, 2009; White, 2014). A partir do ano de 2002 emergência de novas variantes desse genótipo a cada 2-3 anos, resultou em epidemias e pandemias (Siebenga et al., 2009; de Graaf et al, 2016).

1.6.1 - Epidemiologia do genótipo GII.17

Durante o inverno asiático de 2014-2015, um expressivo aumento no número de surtos de GA foi descrito e, foi associado à emergência de uma nova variante do genótipo GII.17, denominada GII.P17-GII.17 Kawasaki_2014, causando o aumento da prevalência dos norovírus em casos de GA, substituindo a variante circulante de GII.4 (Chan et al., 2015, de Graaf et al., 2016, Matsushima et al, 2015; Lu et al., 2016).

Análises filogenéticas do genótipo GII.17 demonstraram que, antes do ano de 2013, as cepas dos norovírus GII.17 evoluíram muito lentamente ao longo de 37 anos, sendo considerado um vírus de padrão evolutivo estático (Parra et al., 2017). Entretanto, a partir do ano de 2013, o padrão evolutivo desse genótipo alterou com a emergência da variante pré-epidêmica que circulou nos anos de 2013-2014, seguida pela diversificação em uma nova variante epidêmica que circulou nos anos de 2014-2015 (Chan et al., 2015; Lu et al., 2016; Ji et al., 2018). Como resultado de mutações pontuais, a variante Kawasaki_2014 se diversificou em duas linhagens diferentes em um período inferior a dois anos. Este padrão se diferencia do padrão de emergência das variantes de GII.4 que são substituídas por novas variantes a cada 3-8 anos (de Graaf et al., 2016; Parra et al., 2017).

Especula-se que a aquisição de uma nova polimerase pelo evento de recombinação que originou a nova variante Kawasaki_2014, possa ter papel importante no novo padrão evolutivo destes vírus (Chan et al., 2015; Lu et al., 2015, 2016; Parra et al., 2017). A evolução rápida desse genótipo permitiu que esses vírus pudessem evadir facilmente o sistema imune da população

vulnerável, o que explica a sua prevalência e associação na maioria de casos de surtos de GA na Ásia (Chan et al., 2015; Lindesmith et al., 2017).

Após causar surtos na Ásia, a nova variante Kawasaki_2014 logo se disseminou, sendo detectada na Europa, América, Austrália e Nova Zelândia (Degiuseppe et al., 2015; Medici et al., 2015; Parra & Green, 2015; de Graaf et al., 2016; Silva et al., 2016). Nos Estados Unidos, essa nova variante foi responsável por 10,4% dos surtos de GA no período de 2015-2016 (Cannon et al., 2017). Recentemente, esses vírus foram detectados com prevalência de 85% em um surto de GA em uma universidade Chinesa, associados a transmissão pessoa-pessoa (Huang et al., 2017). Ainda na China, na província de Guandong, o norovírus GII.17 Kawasaki_2014 representou 83% dos surtos de GA ocorridos durante o período de 2014-2015 (Lu et al., 2015). Na Austrália, a variante emergente foi detectada em amostras de surto de GA em unidades de saúde no período de 2014-2015 (Brugink et al., 2017). Um estudo conduzido na Itália, descreveu a detecção dessa variante, sugerindo um aumento da circulação do genótipo GII.17 entre pacientes pediátricos no inverno de 2015-2016. (Giammanco et al., 2017). Um surto de origem alimentar, ocorrido em um acampamento militar na França, foi associado a contaminação por um preparador de alimentos e acometeu cerca de 35% dos indivíduos levando ao cancelamento de uma missão por falta de pessoal (Sanchez et al., 2017). Na América Latina, essa variante foi detectada em um caso esporádico de GA uma criança menor de 3 anos de idade que apresentou grande número de episódios de diarreia por dia (Degiuseppe et al., 2015).

1.7- Norovírus no Brasil

A primeira descrição dos norovírus no Brasil foi em amostras fecais de pacientes pediátricos sintomáticos e assintomáticos do estado de São Paulo, coletadas no período de 1987 a 1988 (Timenetsky et al., 1993). Estudos de soroprevalência em comunidades carentes indígenas e carentes localizadas na região nordeste, demonstraram presença de anticorpos anti-norovírus em prevalência de 36 a 100% (Gabbay et al., 1994; Talal et al., 2000). Dados epidemiológicos dos norovírus demonstram a importância desses vírus em surtos e casos esporádicos de GA com taxas de prevalências que variam de 7

a 37% (Borges et al., 2006, Castilho et al., 2006; Andreasi et al., 2008; Victoria et al., 2007, Barreira et al., 2010, Ferreira et al., 2010, 2012; Aragão et al., 2013). Alta prevalência dos norovírus em casos de GA também foi demonstrada em estudos conduzidos em diversas regiões do país, apresentando frequências de detecção que variavam de 41,6% a 49,8% e (Ferreira et al., 2010; Morillo et al., 2012; Andrade et al., 2014).

A ampla diversidade dos norovírus é relatada por inúmeros grupos de pesquisa brasileiros, com prevalência do genótipo GII, principalmente do genótipo GII.4 (Barreira et al., 2010; Fioretti et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Aragão et al., 2013). Na região sul do país os norovírus foram responsáveis por 44% dos surtos de GA, com detecção de 12 genótipos diferentes, sendo 72% dos surtos caracterizados associados ao NoV GII.4. O mesmo estudo revelou a circulação de cinco variantes diferentes do genótipo GII.4 em um período de oito anos (Andrade et al., 2014). Além disso, a circulação dos norovírus GII.4 em alta frequência (55%) durante o período de cinco anos em diferentes estados do Brasil já foi reportada (Fioretti et al., 2011). Em outra investigação epidemiológica, foram caracterizadas seis diferentes variantes do genótipo GII.4 circulando no período entre 2004-2012 (Fioretti et al., 2014).

Apesar da predominância do genótipo GII.4, estudos têm descrito a co-circulação deste genótipo com recombinantes de norovírus no Brasil (Hernandez et al., 2016; Barreira et al., 2017; Godim et al., 2018). Recentemente na Amazônia, o genótipo GII.17 foi caracterizado como recombinante em associação com GII.P13-GII.17 (Hernandez et al., 2016).

A variante emergente GII.17 Kawasaki_2014 foi detectada em pacientes pediátricos internados, na região norte do país, e co-circularam com o recombinante GII.Pe-GII.4 Sydney, no entanto sua prevalência foi maior, com frequência de cerca de 38%, frequência nunca descrita anteriormente para este genótipo (Silva et al., 2016). Barreira e colaboradores também detectaram a nova variante GII.P17-GII.17 na região sudeste no ano de 2016, com prevalência de 8,1% (Barreira et al., 2017).

1.8- Vigilância, Prevenção e Controle

As ferramentas de vigilância eletrônica possibilitam a obtenção de dados epidemiológicos e moleculares de casos de surtos e casos esporádicos causados por norovírus, permitindo o melhor entendimento do impacto desses vírus na saúde pública, além de fornecer informações importantes sobre a circulação de genótipos e variantes, essenciais para o desenvolvimento de uma vacina.

Pesquisadores e equipes de saúde pública na Europa, Ásia, Oceania e África têm contribuído sistematicamente com informações sobre a epidemiologia molecular dos norovírus desde de 2005 (Green, 2018). Três redes de vigilância molecular desses vírus estão interligadas nesse sistema de vigilância eletrônica: CaliciNet dos Estados Unidos, a rede de vigilância da Austrália e Nova Zelândia e a rede *Food-borne Viruses in Europe* (FBVE).

Criada e coordenada pelo CDC (do inglês *Centers for Disease Control*), a rede CaliciNet promove a integração entre laboratórios públicos dos Estados Unidos, com o objetivo de elucidar surtos pela identificação do modo de transmissão, evolução do surto e identificação de variantes (CDC, 2011). Ainda nos Estados Unidos, a rede NORS (do inglês *National Outbreak Reporting System*) fornece um sistema nacional integrado de vigilância de surtos de doenças entéricas de transmissão hídrica, doenças por transmissão alimentar, por contato com animais ou contato pessoa-pessoa (NORS, 2018).

A rede NoroNet é a continuação da rede FBVE, uma rede de virologistas e epidemiologistas de 13 países europeus que foi criada com o objetivo de compartilhar dados de vigilância epidemiológica sobre infecções virais, concentrando-se principalmente nos norovírus (Duizer et al, 2008).

Surtos de GA causados por norovírus podem ser interrompidos pela identificação do seu modo de transmissão e adoção de medidas de controle adequadas. Uma das medidas primárias na prevenção e controle da disseminação dos norovírus é a higiene adequada das mãos com água corrente e sabão por no mínimo 20 segundos. Soluções desinfetantes como álcool 70% e álcool em gel podem ser utilizados, mas não devem substituir a lavagem das mãos. É recomendado o afastamento de trabalhadores que estejam infectados por até 48 horas após a resolução dos sintomas, principalmente aqueles que manipulam alimentos e aqueles que trabalham em

unidades de saúde (MacCannell et al., 2011; CDC, 2011). Alimentos que são consumidos crus, como frutas e legumes e hortaliças devem ser lavados. Recomenda-se não ingerir ostras ou moluscos filtradores sem prévio cozimento (CDC, 2011). Com a finalidade de interromper a transmissão e evitar a exposição de indivíduos susceptíveis após um surto ou epidemia de GA causados por norovírus, deve-se interromper o funcionamento de estabelecimentos como restaurantes, escolas, asilos, navios de cruzeiro, resorts e acampamentos (Patel et al., 2009).

Em unidades de saúde, pacientes sintomáticos apresentando vômito e diarreia devem ser isolados até 48 horas após a resolução dos sintomas com o objetivo de evitar a transmissão nosocomial e surtos de GA em ambientes hospitalares (McCall & Smithson 2002; Cooper & Blamey, 2005). Precauções com pacientes infectados por NoV devem ser aumentadas pelos profissionais de saúde, evitando o trânsito entre áreas clínicas e contato com pacientes imunocomprometidos, assim como devem intensificar a higiene frequente das mãos e utilização de EPIs (Equipamentos de Proteção Individual). Em hospitais e unidades de saúde as superfícies, equipamentos e fômites devem ser desinfetados periodicamente com produtos que possuam atividade contra NoV (CDC, 2011), conforme disponibilizado pela EPA (do inglês *Environmental Protection Agency*) (EPA, 2018).

As roupas, lençóis, toalhas e uniformes contaminados devem ser lavados prontamente em água quente, acima de 60°C ou com solução de hipoclorito (5-25%) (CDC, 2011). A solução de hipoclorito na concentração de 1.000-5.000 partes por milhão (ppm) (diluição de 1:50–1:10 do hipoclorito doméstico) é o desinfetante preferencial utilizado na descontaminação de superfícies e objetos, que devem ser expostos à solução durante tempo apropriado (Barker et al., 2004; MacCannell et al., 2011; EPA, 2018). Quaternários de amônio foram descritos como compostos utilizados na descontaminação de superfície, entretanto sua eficácia é menor quando comparada com o hipoclorito (Barker et al., 2004, Jimenez et al., 2006).

1.8.1- Vacinas

Vacinas bivalentes baseadas em VLPs têm demonstrado resultados promissores em animais e humanos, sugerindo que a estratégia de vacina multivalente pode induzir a produção de anticorpos neutralizantes de ampla cobertura contra diferentes cepas de norovírus (Debbink et al., 2014; Cortes-Penfield et al., 2018). Apesar dos resultados promissores, muitas questões precisam ser melhor elucidadas, como a relação entre a resposta imune do hospedeiro e proteção contra a infecção, duração da proteção vacinal e eficiência da proteção heterotípica contra cepas antigenicamente distintas, principalmente devido à grande diversidade genética e antigênica originada pela contínua evolução dos norovírus (Bányai et al., 2018; Cortes-Penfield et al., 2018).

Dois grupos estão desenvolvendo vacinas candidatas contra os norovírus, baseadas em VLPs. Um grupo utiliza VLPs do genótipo GI.1 e VLPs com a sequência consenso de diversas variantes diferentes GII.4, desenvolvida pela Farmacêutica Takeda, anteriormente administrada via intranasal, hoje é administrada via intramuscular e se encontra na fase II de ensaios clínicos em humanos. O outro grupo, ainda em fase de ensaios pré-clínicos, utiliza VLPs de GI.3 e GII.4 no desenvolvimento de uma vacina intramuscular ou intradermal (Debbink et al., 2014; Cortes-Penfield et al., 2018).

Outras duas estratégias se baseiam na expressão da proteína VP1 em vetores recombinantes de adenovírus do tipo 5. A vacina desenvolvida pela farmacêutica Vaxart utiliza a sequência de norovírus GI.1, apresentando a via de administração oral e se encontra na fase I de ensaios clínicos, enquanto que o segundo grupo asiático do Centro de Controle e Prevenção de Doenças da China, utiliza sequência de norovírus GII.4 no desenvolvimento de uma vacina intranasal (Guo et al., 2008, Cortes-Penfield et al., 2018).

Com uma abordagem diferente, um grupo está desenvolvendo uma vacina intranasal baseada em partículas P do genótipo GII.4, contudo ainda está em fase pré-clínica (Tan et al., 2008). Estudos que analisaram a eficácia da vacina bivalente com VLPs GI.1 e GII.4 demonstraram que a imunização induziu a produção de anticorpos com ampla atividade contra os norovírus GII.4, incluindo novas variantes não incluídas na sequência consenso (Lindesmith et al., 2015). Voluntários que tiveram a vacina bivalente de VLPs

GI.1 e GII.4 administrada intramuscularmente, apresentaram redução na gravidade da GA quando desafiados posteriormente com norovírus GII.4 (Bernstein et al., 2015).

Estudos epidemiológicos e de variação genética e antigênica dos norovírus contribuem com dados importantes para a formulação e melhorias necessárias no desenvolvimento de uma vacina contra os norovírus.

2- Relevância

Os norovírus apresentam rápida capacidade evolutiva diversificando-se, sobretudo, pela ocorrência de mutações pontuais e eventos de recombinação (Chan et al., 2015; Cuevas et al., 2016; de Graaf et al., 2016, Parra et al., 2017). A variação antigênica provocada por mutações, principalmente nos cinco epitopos (I-V) presentes na região hipervariável do subdomínio P2, contribui para a diversificação dos norovírus (Siebenga et al., 2009; Lindesmith et al., 2011, 2012). A recombinação intra e intergenotípica, principalmente entre as ORFs 1 e 2, constitui outro importante mecanismo de diversificação, associado à emergência de novas variantes e elevando assim as chances de surtos e epidemias de GA (Bull et al, 2005; Eden et al., 2013).

Apesar da ampla diversidade dos norovírus, GII.4 tem sido o genótipo prevalente em todo o mundo, sendo responsável por inúmeros surtos principalmente devido ao surgimento de variantes em intervalos regulares de tempo (Siebenga et al., 2009; Vinjé et al., 2015; Parra et al., 2017). Todavia, desde o inverno de 2014-2015, uma nova variante do genótipo GII.17 (GIIP.17-GII.17 Kawasaki_2014) foi detectada como a principal causadora de surtos de GA em diversos países da Ásia, substituindo a variante circulante de GII.4 (Chan et al., 2015, Matsushima et al., 2015, Lu et al., 2016).

No Brasil, diversos estudos têm demonstrado a diversidade genética dos norovírus circulantes, sendo GII.4 o genótipo mais prevalentemente encontrado, inclusive com variantes distintas (Barreira et al., 2010, Fioretti et al., 2011; Aragão et al., 2013; Andrade et al., 2014). Norovírus recombinantes também foram descritos em estudos epidemiológicos conduzidos nas regiões sudeste, norte e nordeste (Castilho et al., 2006; Fioretti et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Aragão et al., 2013; Hernandez et al., 2016). O norovírus GII.17 foi detectado em baixa prevalência no país, em diversos estudos conduzidos em anos anteriores ao surgimento da nova variante GIIP.17-GII.17 Kawasaki_2014 (Fioretti et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Andrade et al., 2014; Aragão et al., 2013). Quando detectados, esses vírus foram frequentemente caracterizados como recombinantes: GII.Pe-GII.17, GII.13-GII.17, GII.7-GII.17 (Andrade et al., 2016; Siqueira et al., 2017).

Diversos aspectos do mundo moderno, incluindo a facilidade e a rapidez de deslocamento têm sido responsáveis pela dispersão e pelo impacto de

variantes e recombinantes de norovirus emergentes em surtos de GA (CDC, 2009; Ferreira et al., 2012; Sanchez et al., 2017; Huang et al., 2017). No Brasil, na última década, o crescimento na temporada de navios de cruzeiros, assim como realização de grandes eventos, tais como a Copa do Mundo (2014) e Olimpíadas (2016) incrementou a entrada de turistas no país possibilitando a introdução de novos vírus em uma população imunologicamente susceptível.

O monitoramento da emergência de novas variantes e recombinantes é uma ferramenta essencial na saúde pública. Deste modo, a constante vigilância dos norovírus se mostra essencial no fornecimento de dados sobre distribuição geográfica, temporal, dispersão e prevalência. As análises genômica e evolutiva desses vírus são relevantes para conhecimento da relação genética com outras variantes e genótipos, provendo melhor entendimento do efeito da diversidade dos vírus circulantes e sua prevalência na população, assim como sua relação em casos de surtos.

Considerando o cenário epidemiológico dos norovírus, a busca para o desenvolvimento de uma vacina eficaz é crescente, tornando-se fundamental o conhecimento prévio das variantes epidêmicas, pelo monitoramento dos genótipos circulantes. Até o momento, nenhum estudo genético e evolutivo foi conduzido no Brasil levando em consideração o genoma completo dos norovírus.

3- Objetivos

3.1- Objetivo geral

Realizar vigilância dos norovírus em casos de GA ocorridos em diferentes regiões do Brasil, no período de 2004 a 2016, pela detecção e caracterização molecular de recombinantes e variantes emergentes.

3.2- Objetivos específicos

1. Investigar a circulação de recombinantes de norovírus GII em amostras provenientes de surtos de GA caracterizados como não-GII.4 entre 2004 e 2011 na região Sul do Brasil;
2. Caracterizar a introdução da variante emergente GII.P17-GII-17 Kawasaki_2014 no Brasil em 2015 por estudos filogenéticos e de filogeografia;
3. Investigar a associação da variante GII.17 Kawasaki_2014 ao surto de GA de transmissão alimentar ocorrido em 2016;
4. Realizar a caracterização molecular baseada no genoma completo das cepas brasileiras da nova variante, comparando as alterações genéticas das ORFs1-3 e antigênicas do subdomínio P2 da proteína VP1.

4- Resultados

Os resultados deste trabalho de tese são apresentados em forma de manuscritos publicados e submetido à publicação.

4.1- Artigo1: ***Norovirus Recombinant strains isolated from gastroenteritis outbreaks in Southern Brazil, 2004-2011.*** Publicado na revista *Plos One*.

4.2- Artigo 2: ***Detection and molecular characterization of emergent GII.P17/GII.17 Norovirus in Brazil, 2015.*** Publicado na revista *Infection, Genetics and Evolution*.

4.3- Artigo 3: ***Norovirus GII.17 Associated with a Foodborne Acute Gastroenteritis Outbreak in Brazil, 2016.*** Publicado na revista *Food and Environmental Virology*.

4.4- Artigo 4: ***Molecular analysis of complete nucleotide sequences of norovirus GIIP.17-GII.17 detected in Brazil.*** Submetido à publicação na revista *Viruses*.

4.1- Norovirus Recombinant strains isolated from gastroenteritis outbreaks in Southern Brazil, 2004-2011



RESEARCH ARTICLE

Norovirus Recombinant Strains Isolated from Gastroenteritis Outbreaks in Southern Brazil, 2004–2011

Tulio Machado Fumian^{*†}, Juliana da Silva Ribeiro de Andrade[‡], José Paulo Gagliardi Leite, Marize Pereira Miagostovich

Objetivo:

- 1. Investigar a circulação de recombinantes de norovírus do genogrupo GII em amostras provenientes de surtos de GA caracterizados como não-GII.4 entre 2004 e 2011;

RESEARCH ARTICLE

Norovirus Recombinant Strains Isolated from Gastroenteritis Outbreaks in Southern Brazil, 2004–2011

Tulio Machado Fumian*[‡], Juliana da Silva Ribeiro de Andrade[‡], José Paulo Gagliardi Leite, Marize Pereira Miagostovich

Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

[‡] These authors contributed equally to this work.

* tuliofmf@ioc.fiocruz.br



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Fumian TM, da Silva Ribeiro de Andrade J, Leite JPG, Miagostovich MP (2016) Norovirus Recombinant Strains Isolated from Gastroenteritis Outbreaks in Southern Brazil, 2004–2011. PLoS ONE 11(4): e0145391. doi:10.1371/journal.pone.0145391

Editor: Shamala Devi Sekaran, University of Malaya, MALAYSIA

Received: August 13, 2015

Accepted: December 3, 2015

Published: April 26, 2016

Copyright: © 2016 Fumian et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: 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: KR074148 - KR074191.

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 and JPG Leite are CNPq fellows. The funders had no role in study design, data collection

Abstract

Noroviruses are recognized as one of the leading causes of viral acute gastroenteritis, responsible for almost 50% of acute gastroenteritis outbreaks worldwide. The positive single-strand RNA genome of noroviruses presents a high mutation rate and these viruses are constantly evolving by nucleotide mutation and genome recombination. Norovirus recombinant strains have been detected as causing acute gastroenteritis outbreaks in several countries. However, in Brazil, only one report of a norovirus recombinant strain (GII.P7/GII.20) has been described in the northern region so far. For this study, 38 norovirus strains representative of outbreaks, 11 GI.4 and 27 non-GI.4, were randomly selected and amplified at the ORF1/ORF2 junction. Genetic recombination was identified by constructing phylogenetic trees of the polymerase and capsid genes, and further SimPlot and Bootscan analysis of the ORF1/ORF2 overlap. Sequence analysis revealed that 23 out of 27 (85%) non-GI.4 noroviruses were recombinant strains, characterized as: GI.4/P7/GI.6 (n = 9); GI.4/g/GI.12 (n = 4); GI.4/P16/GI.3 (n = 4); GI.4/Pe/GI.17 (n = 2); GI.4/P7/GI.14 (n = 1); GI.4/P13/GI.17 (n = 1); GI.4/P21/GI.3 (n = 1); and GI.4/P21/GI.13 (n = 1). On the other hand, among the GI.4 variants analyzed (Den Haag_2006b and New Orleans_2009) no recombination was observed. These data revealed the great diversity of norovirus recombinant strains associated with outbreaks, and describe for the first time these recombinant types circulating in Brazil. Our results obtained in southern Brazil corroborate the previous report for the northern region, demonstrating that norovirus recombinant strains are circulating more frequently than we expected. In addition, these results emphasize the relevance of including ORF1/ORF2-based analysis in surveillance studies as well as the importance of characterizing strains from other Brazilian regions to obtain epidemiological data for norovirus recombinant strains circulating in the country.

and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

Introduction

Noroviruses (NoV) are members of the *Caliciviridae* family, and is now recognized as one of the leading causes of acute gastroenteritis (AGE), responsible for almost 50% of AGE outbreaks worldwide [1,2]. NoV are primarily associated with outbreaks of AGE in semi-closed settings such as elderly care facilities, hospitals, cruise ships and childcare centers [2,3]. These epidemics have occurred globally since the mid-1990s with increasing frequency [4,5]. Consequently, NoV-associated AGE has become a major public health concern for which there is no available anti-viral agent or preventative vaccine yet available.

NoV present a positive-polarity RNA genome of approximately 7500 nucleotides (nt) in length, presenting a high mutation rate and high genetic variability; it is organized as three open reading frames (ORFs), with ORF1 and ORF2 overlapping by about 20 nt [6,7]. ORF1 encodes non-structural proteins including RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). ORF2 encodes a major capsid protein (VP1) that contains an N-terminal arm, a shell or S-domain and a protrusion or P-domain, and ORF3 encodes a minor capsid protein (VP2); both proteins are translated from subgenomic RNA [8]. NoV have been classified into six genogroups (GI to GVI) based on VP1 amino acid sequence [9]. Each genogroup can be further divided into genotypes, and at least 36 genotypes are recognized to date [10–12]. NoV are in constant evolution, with new strains frequently arising due to nucleotide point mutation (antigenic drift) and genetic recombination during a co-infection [13]. Recombination is one of the main driving forces shaping the evolution of viruses, providing a mechanism for generating antigenically novel viruses and, therefore, the ability to evade the immune system [13,14]. In the NoV genome, a recombination hotspot is present near the ORF1/ORF2 junction and a variety of recombinant strains have been detected worldwide [7,13,15–18].

In Brazil, the role of NoV as causative agents of AGE causing outbreaks, sporadic cases, and hospitalization are well documented [19–23]. However, there is a lack of data concerning knowledge of the circulation of NoV recombinant strains in the Brazilian population, since only one report demonstrated a recombinant strain (GII.P7/GII.20) in a community of African descent in northern Brazil [24].

Recently, it was demonstrated the importance of NoV in AGE outbreaks in Southern Brazil, but genotype characterization was performed based only on capsid gene sequences [19]. In the present study, we aimed to investigate the occurrence of recombination in NoV strains associated with AGE outbreaks in the Rio Grande do Sul state (southern region of Brazil) between 2004 and 2011. The recombinant strains were identified by sequence analysis of the ORF1/ORF2 junction region, followed by SimPlot and Bootscan analysis.

Materials and Methods

Ethics statement

AGE surveillance is performed through a hierarchical network in which samples are provided by medical request in hospitals and health centers, monitored by the Brazilian Unified Health System (SUS). Fecal samples were collected by the state Central Laboratory and then forwarded to the Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), Ministry of Health. Forms with epidemiological and clinical data accompanied each fecal sample. No patient information was used other than to determine city residence or possible association with outbreaks, and data were maintained anonymously and securely. This study is part of a project that covers diagnosis, surveillance and molecular epidemiology of viruses that cause AGE, approved by the Ethics Committee of FIOCRUZ (CEP No. 311/06).

Clinical samples

NoV-positive stool samples were collected and analyzed during a retrospective study, as reported previously, that aimed to describe the role of these viruses in causing AGE outbreaks which occurred in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil, in a period of eight years (2004–2011) [19]. For this study, 38 NoV strains representative of outbreaks, 11 GII.4 and 27 non-GII.4, were selected randomly and amplified at the ORF1/ORF2 junction (524nt).

RNA extraction and cDNA synthesis

Viral RNA was purified from stool samples stored at -20°C . A 140 μL suspension (10% w/v) of each stool sample was prepared with Tris-calcium buffer (pH = 7.2) and subjected to an automatic RNA extraction procedure using a QIAamp[®] Viral RNA Mini kit (QIAGEN, CA, USA) and a QIAcube[®] automated system (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. Part of the isolated nucleic acid was transcribed to cDNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies[™], NY, USA), and an aliquot was immediately stored at -80°C . In each extraction procedure, RNase/DNase-free water was used as negative control.

Norovirus genotyping

PCR was performed using primers targeting the ORF1/2 junction region, Mon 431/432 [25] and G2SKR [26], to generate 544 bp amplicons. The reaction was performed in a 50 μL mixture of 10 μL cDNA, 5 U Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Life Technologies[™]), and 250 nM of each primer. PCR amplification was performed with an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 50°C for 30 s, extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The amplicons obtained were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. For DNA sequencing, the purified products were sent to the FIOCRUZ Institutional Platform for DNA sequencing (PDTIS), performed using an ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit[®] and ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (both from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Following chromatogram analysis, consensual sequences were obtained using BioEdit [27]. Initially, NoV genotypes were assigned using an online genotyping tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) [11] and the strains were named, with the genotype of the polymerase indicated with an uppercase letter p, as proposed by Kroneman et al. [12].

Recombination analysis

After results were obtained from the genotyping tool, two sequence datasets were constructed, one considering the region coding RdRp (partial ORF1) and the other including the capsid coding region (partial ORF2). Comparable sequences containing ORF1/ORF2 overlap for different NoV genotypes were retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Phylogenetic analysis was performed for both datasets including comparable sequences of different NoV genotypes. Phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method (Kimura two-parameter model, 2000 bootstrap replications for branch support) in MEGA 6.0 [28]. To further confirm putative recombinant strains and to identify a putative recombination point according with previous reports [13], plot similarity was carried out using SimPlot version 3.5.1 [29]. SimPlot analysis was performed by setting the window width and the step size to 200 bp and 20 bp, respectively. Different methods implemented in the Recombination Detection Program v.4.16 (RDP4) were also used [30], such as Bootscan/ Recscan analysis. The sequences obtained in the present study were included as queries, while

putative parental sequences were obtained from the GenBank database, and recombinant strains were confirmed with significant events ($p < 0.01$).

GenBank accession numbers

The nucleotide sequences obtained in this study were submitted to the NCBI (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and received accession numbers KR074148–KR074191.

Results

NoV recombinant genotypes were characterized in 23 out of 27 (85%) of the non-GII.4 samples, identified by constructing phylogenetic trees of polymerase and capsid genes, and further SimPlot analysis of the ORF1/ORF2 overlap (Figs 1 and 2). NoV recombinant strains were identified as: GII.P7/GII.6 ($n = 9$); GIIP.g/GII.12 ($n = 4$); GII.P16/GII.3 ($n = 4$); GII.Pe/GII.17 ($n = 2$); GII.P7/GII.14 ($n = 1$); GII.P13/GII.17 ($n = 1$); GII.P21/GII.3 ($n = 1$); and GII.P21/GII.13 ($n = 1$) (Table 1).

SimPlot and Bootscan analysis showed recombination breakpoints near the ORF1/2 junction for all samples (Figs 3 and 4). The most detected recombinant type was GII.P7/GII.6, with strains detected in four years (2004, 2007, 2008, and 2010). Among these nine samples, nucleotide identity ranged from 92% to 99%. We performed SimPlot and Bootscan analysis of four GII.P7/GII.6 strains (one sample for each year) and the recombination breakpoints were detected at positions varying from nucleotides 184 to 200, corresponding to nucleotides 5022–

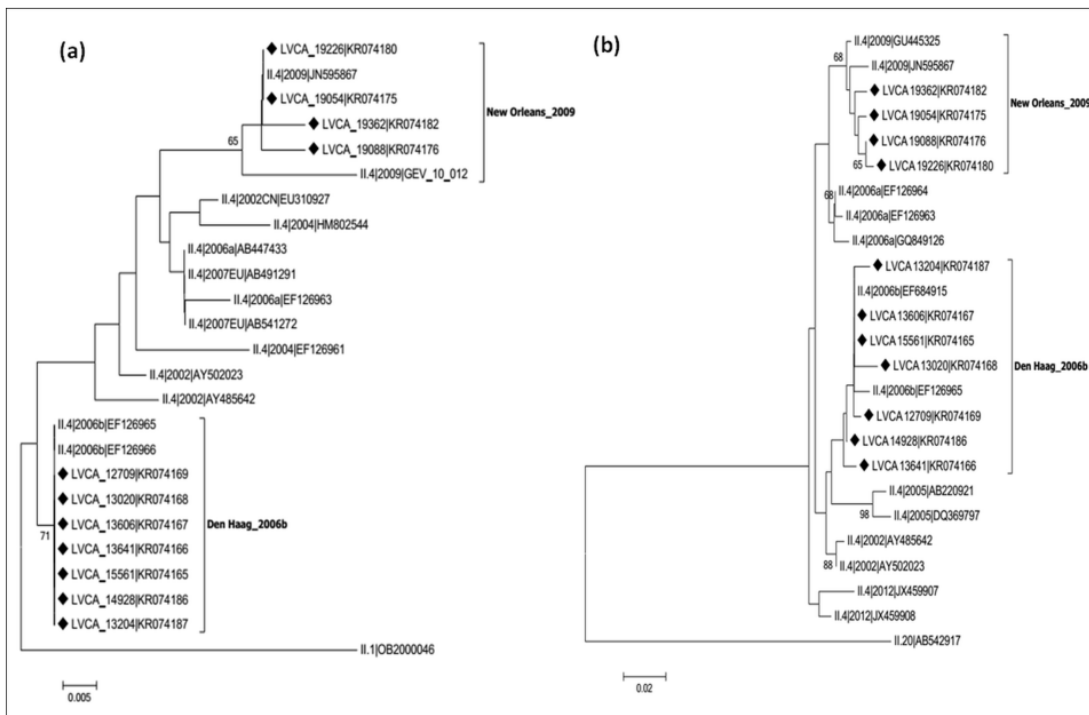


Fig 1. Phylogenetic analyses of NoV GII.4 sequences based on the polymerase region (ORF1) and capsid region (ORF2). (a) Phylogenetic tree of 231 bp within the polymerase region (3' ORF1). (b) Phylogenetic tree of 277 bp within the capsid region (5' ORF2). References strains of NoV GII.4 variants are named according to GenBank with their respectively accession numbers. Brazilian GII.4 strains are marked with a filled diamond. The scale bar at the bottom of the tree indicates distance. Bootstrap values (2,000 replicates) are shown at the branch nodes and values lower than 60% are not shown.

doi:10.1371/journal.pone.0145391.g001

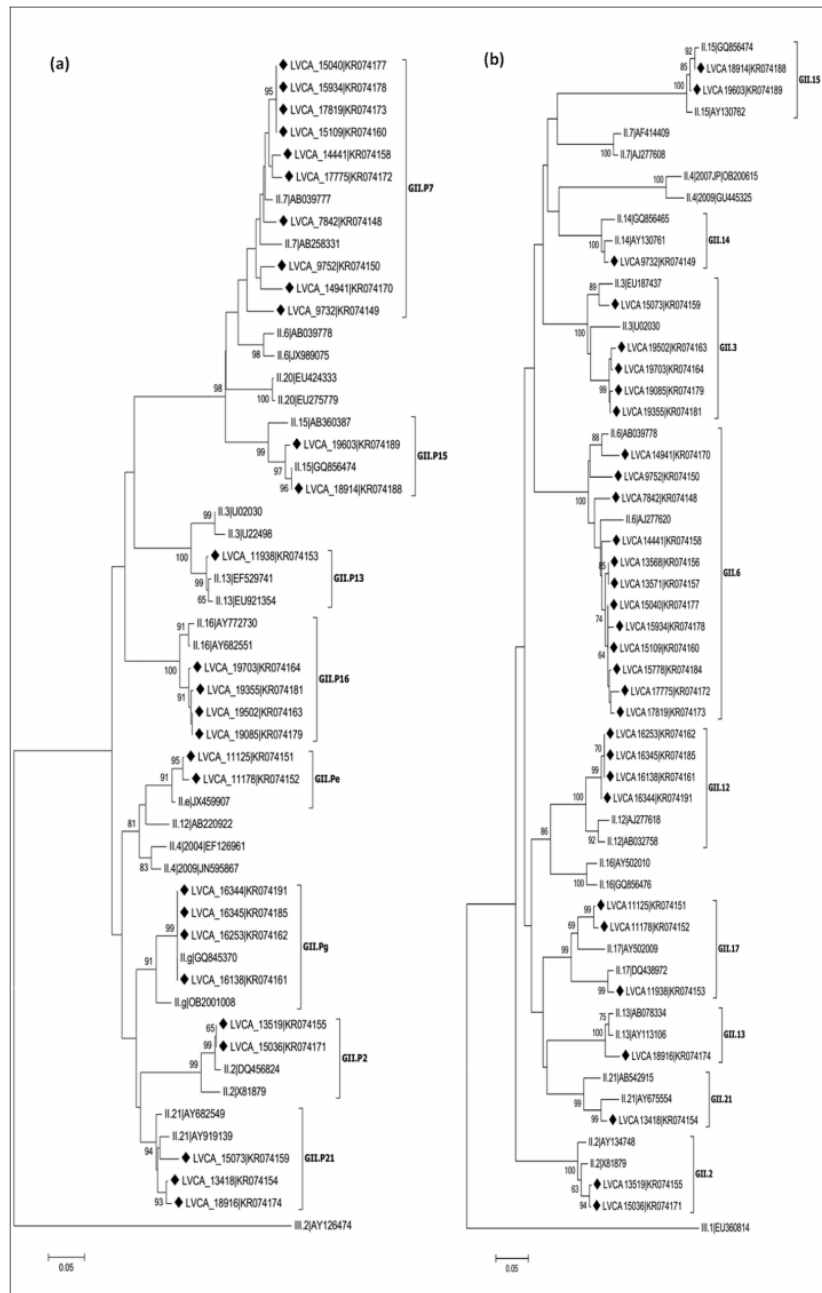


Fig 2. Phylogenetic analyses of NoV GII sequences based on the polymerase and capsid regions. (a) Phylogenetic tree of 231 bp within the polymerase region (3'-ORF1). (b) Phylogenetic tree of 277 bp within the capsid region (5'-ORF2). Reference strains of NoV genotypes are named according to GenBank with their respective accession numbers. Brazilian GII.4 strains are marked with a filled diamond. The scale bar at the bottom of the tree indicates distance. Bootstrap values (2000 replicates) are shown at the branch nodes and values lower than 60% are not shown.

doi:10.1371/journal.pone.0145391.g002

Table 1. NoV recombinant sequences detected in Southern Brazil during the period of 2004–2011, with the partial 3'-ORF1 and 5'-ORF2 of NoV genome.

Year	Sample identification	Accession number	Acute gastroenteritis outbreak date(month/year)	NoV Genotyping		Bootscan p-value
				ORF1	ORF2	
2004	LVCA-7842	KR074148	12/2004	GII.P7	GII.6	6.027 x 10 ⁻⁴
	LVCA-9732	KR074149	09/2004	GII.P7	GII.14	3.610 x 10 ⁻⁴
	LVCA-9752	KR074150	09/2004	GII.P7	GII.6	9.343 x 10 ⁻³
2005	LVCA-11125	KR074151	08/2005	GII.Pe	GII.17	4.141 x 10 ⁻⁵
	LVCA-11178	KR074152	09/2005	GII.Pe	GII.17	6.426 x 10 ⁻⁵
2006	LVCA-11938	KR074153	03/2006	GII.P13	GII.17	8.085 x 10 ⁻⁹
2007	LVCA-14441	KR074158	10/2007	GII.P7	GII.6	7.127 x 10 ⁻⁴
	LVCA-14941	KR074170	04/2008	GII.P7	GII.6	8.509 x 10 ⁻⁴
2008	LVCA-15040	KR074177	04/2008	GII.P7	GII.6	2.093 x 10 ⁻⁵
	LVCA-15073	KR074159	04/2008	GII.P21	GII.3	8.195 x 10 ⁻⁷
	LVCA-15109	KR074160	05/2008	GII.P7	GII.6	2.807 x 10 ⁻⁴
	LVCA-15934	KR074178	11/2008	GII.P7	GII.6	5.513 x 10 ⁻⁵
2009	LVCA-16138	KR074161	01/2009	GII.Pg	GII.12	1.680 x 10 ⁻⁴
	LVCA-16253	KR074162	03/2009	GII.Pg	GII.12	1.255 x 10 ⁻⁴
	LVCA-16344	KR074191	04/2009	GII.Pg	GII.12	8.017 x 10 ⁻⁵
	LVCA-16345	KR074185	04/2009	GII.Pg	GII.12	3.012 x 10 ⁻⁴
2010	LVCA-17775	KR074172	03/2010	GII.P7	GII.6	5.943 x 10 ⁻⁴
	LVCA-17819	KR074173	03/2010	GII.P7	GII.6	1.242 x 10 ⁻⁴
	LVCA-18916	KR074174	09/2010	GII.P21	GII.13	7.077 x 10 ⁻¹¹
	LVCA-19085	KR074179	11/2010	GII.P16	GII.3	8.609 x 10 ⁻¹¹
2011	LVCA-19355	KR074181	01/2011	GII.P16	GII.3	4.847 x 10 ⁻¹⁰
	LVCA-19502	KR074163	01/2011	GII.P16	GII.3	7.580 x 10 ⁻¹¹
	LVCA-19703	KR074164	03/2011	GII.P16	GII.3	8.050 x 10 ⁻¹⁰

doi:10.1371/journal.pone.0145391.t001

5038 in relation to the reference strain Lordsdale (accession number X86557), localized in the ORF1/2 junction. The location of the recombination breakpoint, near the ORF junction, was similar in all recombinant samples (Figs 3 and 4).

The recombinant types GII.Pe/GII.17 and GII.Pg/GII.12 were detected only in 2005 and 2009, respectively. The four detected samples characterized as GII.Pg/GII.12 showed a high nucleotide identity (> 99%), and were detected in the months of January, March and April. Both ORF1 and ORF2 genotypes of the two samples GII.Pe/GII.17 clustered together in the phylogenetic tree with a nucleotide identity of 99% in the region analyzed. Interestingly, the recombinant GII.P13/GII.17, detected in the following year, has an ORF2 genotype grouped in a separate cluster compared with the sample GII.Pe/GII.17. Samples belonging to the recombinant GII.P16/GII.3 were detected in 2010 and 2011, with genotypes characterized from both regions grouping in the same cluster. The sample LVCA_15073 (GII.P21/GII.3) presented distinct genotypes (both ORF1 and ORF2) that grouped in a separate cluster, when compared with samples GII.P21/GII.13 and GII.P16/GII.3. The four NoV non-recombinant samples were genotyped as GII.P2/GII.2 (n = 2), and GII.P15/GII.15 (n = 2) (Fig 2).

Concerning the 11 NoV GII.4 strains analyzed, no recombination type was identified. GII.4 variants detected were Den Haag_2006b and New Orleans_2009, in both regions analyzed (3'-ORF1 and 5'-ORF2) (Fig 2). These GII.4 samples were detected from 2006 to 2011, and strains shared nucleotide sequence identities between 95% and 99%. Samples belonging to the Den

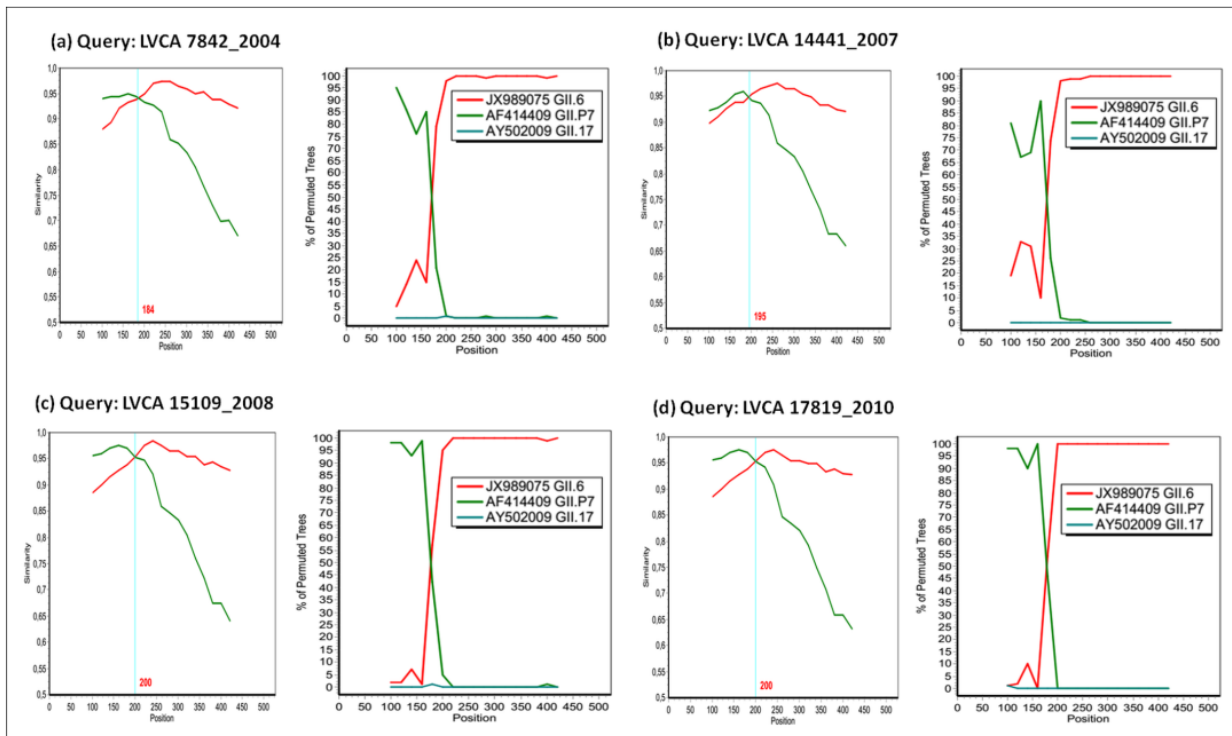


Fig 3. Simplot and Bootscan analyses of the NoV recombinant GII.P7/GII.6 detected in four different years. (a) LVCA7842, (b) LVCA14441, (c) LVCA15109, and (d) LVCA17819. For similarity plot, the y-axis gives the percentage of identity within a sliding window of 200 bp wide, with a step size between plots of 20 bp. The site where the two NoV parental strains of genotypes GII.6 (JX989075) and GII.7 (AF414409) have equal identity to the recombinant (crossed by the vertical blue lines) is the predicted site of recombination. For Bootscan, the y-axis gives the percentage of bootstrap support values of permuted trees using a sliding window of 200 bp wide with a step size between plots of 20 bp. GII.17 strain (AY502009) was used as an outlier sequence.

doi:10.1371/journal.pone.0145391.g003

Haag_2006b variant were collected for three years (2006–2008), and samples belonging to the New Orleans_2009 variant were detected in 2010 and 2011. Among samples of both variant groups, nucleotide sequence identities ranged from 98% to 99%.

Discussion

For the first time in Brazil, we are reporting eight different NoV recombinant strains responsible for AGE outbreaks in the southern region from 2004 to 2011. We observed a high prevalence of NoV recombinant strains (85%) among the non-GII.4 samples analyzed.

Genetic recombination is a widespread phenomenon in NoV, which has a major impact on their evolution and genotype diversity, and has been associated with the emergence of new genotypes. As most NoV recombination occurs in a single hotspot breakpoint located in the ORF1/ORF2 overlap [13,31], a combined characterization of both the polymerase and capsid regions is important to monitor new NoV genotype emergence and recombinant strains [32–35]. Our results emphasize the importance of including the characterization of both regions in surveillance studies since it is probable that the real magnitude of NoV recombination is underestimated in other Brazilian regions and equally in other countries.

The GII.P7/GII.6 was the most frequent recombinant and, unlike the other detected recombinant strains, had a long period of circulation (2004–2010). The GII.P7 genotype was associated with the GII.14 capsid genotype in 2004. In a study performed in a semi-closed

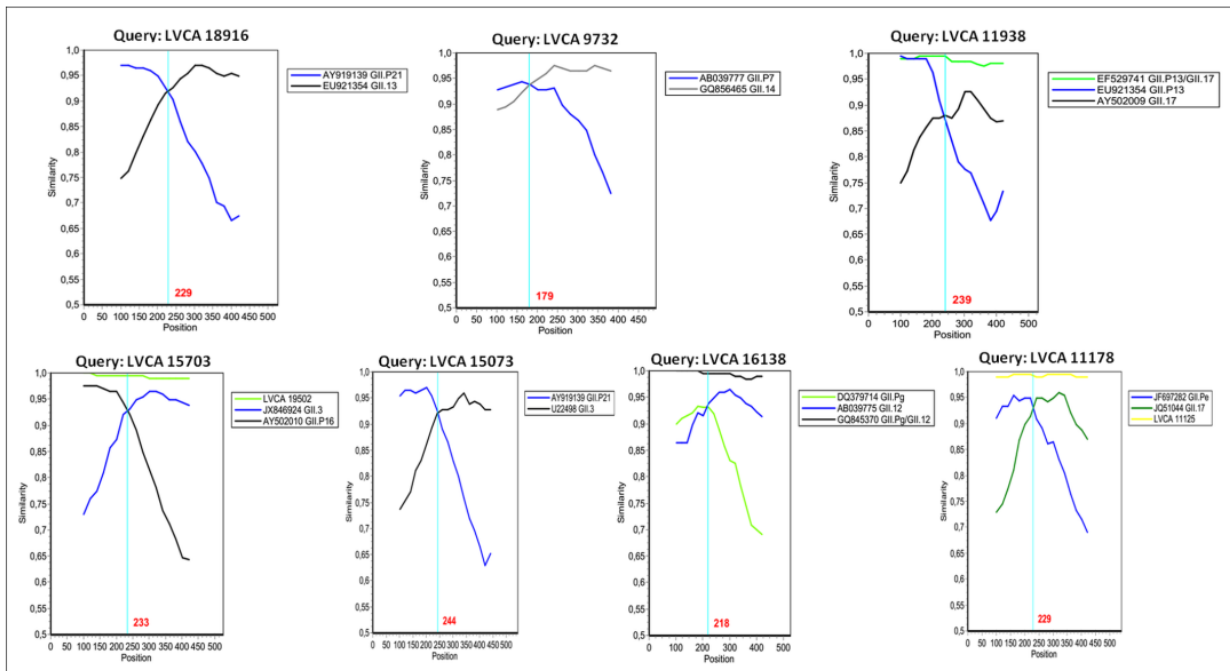


Fig 4. Similarity plots of the NoV recombinant types detected in Southern Brazil during the 2004–2011 period. SimPlot was constructed using Simplot version 3.5.1 with a slide window width of 200 bp and a step size of 20 bp. The vertical axis indicates nucleotide identities (%) between the query sequences (Brazilian samples) and the reference strains. NoV parental strains are indicated by the accession numbers and their respectively ORF1-based genotypes (indicated by the letter P) or ORF2-based genotypes.

doi:10.1371/journal.pone.0145391.g004

community of African descent in northern Brazil in 2008, GII.P7 was described as a recombinant GII.P7/GII.20 detected in a stool sample of a child with NoV-associated gastroenteritis [24]. Also in Brazil, the NoV genotype GII.6 was detected in southeastern and northeastern regions in 2003–2005 and 2007–2008 [36–38]. This recombinant type (GII.P7/GII.6) was first described in 2011 in Burkina Faso [39]. GII.P7/GII.6 recombinants were also reported in other countries such as Italy, Finland, China, and South Africa [34,40–44]. In South America, this recombinant was reported between 2011 and 2012, in diarrheic stool and vomit samples from Uruguayan patients [35]. Due to the high nucleotide similarity between the Uruguayan and Brazilian samples (93%–97%), and taking into account that the Brazilian state of Rio Grande do Sul borders Uruguay, it is possible that the same recombinant strain has circulated in both countries.

The recombinant GII.Pg/GII.12 was the second most frequent found in the present study, although it was detected only in 2009. In that same year in Brazil, the genotype GII.12 was observed circulating in two different regions: northeastern and southeastern [37]; however, as the polymerase genotype was not characterized, we cannot affirm that these samples share the same genetic recombination type. The recombinant GII.Pg/GII.12 was described for the first time in Australia in 2008, from sporadic AGE cases, and in the same year causing outbreaks in New Zealand [33]. In the period 2009–2010, the recombinant GII.Pg/GII.12 had spread worldwide, and was mainly associated with AGE outbreaks [18,31,41,45–49]. As stated by Sang et al., the global spread of GII.Pg/GII.12 strains could be associated with their high evolution rates compared to rates observed for GII.4 [32]. In 2012, this recombinant was reported for the first time in the African continent [34].

Here, we also detected the capsid genotype GII.17 associated with two distinct genotypes, GII.Pe ($n = 2$) and GIIP.13 ($n = 1$) in 2005 and 2006, respectively. As they were grouped in a separate phylogenetic cluster, this could indicate that two lineages of the GII.17 genotype may be circulating in Brazil. The genotype GII.17 was also detected in northern Brazil in 2005 and 2009 in the states of Acre and Pará, respectively [22,37]. Globally, GII.Pe has been described as a recombinant in association with other capsid genotypes such as: GII.2, GII.3, GII.4 and GII.12 [33,40,47]. In 2012, the emergence of the new pandemic NoV GII.4 variant Sydney_2012 as a recombinant form (GII.Pe/GII.4) was reported, which led to an increase in NoV activity and associated AGE epidemics in countries including Australia, New Zealand, France, Japan, China and the United States [17,50–52]. The emergence of the pandemic GII.4 variant, which originated from genome recombination, highlights the significance of an antigenic shift on NoV evolution. The capsid genotype GII.17 is described as a recombinant strain in association with the most common GII.P13 ORF1 genotype, although other recombinant forms have been identified such as GII.P16, GII.P3 and GII.P4 [53]. The two samples characterized as recombinant GII.Pe/GII.17 could represent the first description of this recombinant strain.

Another recombinant strain detected in this study was GII.P16/GII.3, found in 2010 and 2011. In the same period, this recombinant was detected for the first time in Bangladesh, India and Italy [40,54]. The capsid genotype GII.3 was the second most frequent detected during a surveillance study carried out in southeastern Brazil in 2003–2004 [38]. In our study, the GII.3 capsid genotype was also detected as a recombinant strain associated with GII.P21 in 2008, but samples were grouped into different genetic clusters according to their polymerase genotypes. Both recombinant strains were also detected in Spain between 2009 and 2012, with GII.P21/GII.3 and GII.P16/GII.3 corresponding to 28.4% and 18.5% of all recombinant strains characterized, respectively [18].

In conclusion, we demonstrated the high diversity of recombinant strains causing AGE outbreaks in southern Brazil in 2004–2011, which represented the main percentage (85%) of non-GII.4 NoV. These data are in agreement with data obtained from a study conducted in Singapore, where only GII.6 and GII.7 capsid genotypes were non-recombinant viruses of all the non-GII.4 strains detected [49]. Our data show that the circulation of NoV recombinant strains is common in southern Brazil, with real potential ability to cause AGE outbreaks. The great diversity and the high frequency of recombinants circulating in our country demonstrates the importance of ongoing surveillance to understand the role of these recombinant strains in the dynamic of NoV infections. Inter or intra-genotype recombination allows increased fitness and viral evolution, enabling NoV to escape and spread in a susceptible population, with direct implications in NoV-infections incidence and for design of an effective vaccine. Therefore, the appropriate characterization of NoV strains is fundamental for performing an adequate epidemiological surveillance, highlighting the importance of a combined ORF1/ORF2 characterization to access the circulation and genetic diversity of NoV recombinant strains worldwide.

Acknowledgments

The authors thank the staff of the Central Laboratory of Rio Grande do Sul state (LACEN, RS) for sending the clinical specimens.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TMF JSRA JPGL MPM. Performed the experiments: TMF JSRA. Analyzed the data: TMF JSRA JPGL MPM. Contributed reagents/materials/analysis tools: TMF JSRA JPGL MPM. Wrote the paper: TMF JSRA JPGL MPM.

References

1. Atmar RL, Estes MK (2006) The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am* 35:275–90. PMID: [16880066](#)
2. Glass RI, Parashar UD, Estes MK (2009) Norovirus Gastroenteritis. *N Engl J Med* 361:1776–85. doi: [10.1056/NEJMra0804575](#) PMID: [19864676](#)
3. Hall AJ, Wikswo ME, Manikonda K, Roberts VA, Yoder JS, Gould LH (2013) Acute gastroenteritis surveillance through the National Outbreak Reporting System, United States. *Emerg Infect Dis* 19:1305–9. doi: [10.3201/eid1908.130482](#) PMID: [23876187](#)
4. Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, et al. (2009) Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001–2007. *J Infect Dis* 200:802–812. doi: [10.1086/605127](#) PMID: [19627248](#)
5. Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J (2014) Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *J Clin Microbiol* 52:147–55. doi: [10.1128/JCM.02680-13](#) PMID: [24172151](#)
6. Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK (1990) Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 4:1580–3.
7. Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA (2005) Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis* 11:1079–85. PMID: [16022784](#)
8. Green K. Caliciviridae: the noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffi n DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al., editors. *Fields virology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p.949–79.
9. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS (2006) Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346:312–23. PMID: [16343580](#)
10. Mesquita JR, Barclay L, Nascimento MS, Vinje J (2010) Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerg Infect Dis* 16:980–982. doi: [10.3201/eid1606.091861](#) PMID: [20507751](#)
11. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort HV, Peñaranda S, Oberste MS, et al. (2011) An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol* 51:121–5. doi: [10.1016/j.jcv.2011.03.006](#) PMID: [21514213](#)
12. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, et al. (2013) Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol* 158:2059–68. doi: [10.1007/s00705-013-1708-5](#) PMID: [23615870](#)
13. Bull RA, Tanaka MM, White PA (2007) Norovirus recombination. *J Gen Virol* 88:3347–59. PMID: [18024905](#)
14. White PA (2014) Evolution of norovirus. *Clin Microbiol Infect* 20:741–5. doi: [10.1111/1469-0691.12746](#) PMID: [24980204](#)
15. Chhabra P, Walimbe AM, Chitambar SD (2010) Molecular characterization of three novel intergenotype norovirus GII recombinant strains from western India. *Virus Res* 147:242–246. doi: [10.1016/j.virusres.2009.11.007](#) PMID: [19941918](#)
16. Mahar JE, Kirkwood CD (2011) Characterization of norovirus strains in Australian children from 2006 to 2008: prevalence of recombinant strains. *J Med Virol* 83:2213–2219. doi: [10.1002/jmv.22215](#) PMID: [22012731](#)
17. Eden JS, Tanaka MM, Boni MF, Rawlinson WD, White PA (2013) Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J Virol* 87:6270–82. doi: [10.1128/JVI.03464-12](#) PMID: [23536665](#)
18. Arana A, Cilla G, Montes M, Gomariz M, Pérez-Trallero E (2014) Genotypes, recombinant forms, and variants of norovirus GII.4 in Gipuzkoa (Basque Country, Spain), 2009–2012. *PLoS One* 9:e98875. doi: [10.1371/journal.pone.0098875](#) PMID: [24893307](#)
19. Andrade JSR, Rocha MS, Carvalho-Costa FA, Fioretti JM, Xavier Mda P, Nunes ZM, et al. (2014) Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004–2011. *J Clin Virol* 61:345–52. doi: [10.1016/j.jcv.2014.08.024](#) PMID: [25223919](#)
20. Fioretti JM, Bello G, Rocha MS, Victoria M, Leite JP, Miagostovich MP (2014) Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS One* 25:e92988.
21. Fumian TM, Justino MC, D'Arc Pereira Mascarenhas J, Reymão TK, Abreu E, Soares L, et al. (2013) Quantitative and molecular analysis of noroviruses RNA in blood from children hospitalized for acute gastroenteritis in Belém, Brazil. *J Clin Virol* 58:31–5. doi: [10.1016/j.jcv.2013.06.043](#) PMID: [23886502](#)
22. Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, de Lucena MS, Siqueira JA, Fumian TM, et al. (2013) Norovirus diversity in diarrheic children from an African-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. *PLoS One* 8:e56608. doi: [10.1371/journal.pone.0056608](#) PMID: [23457593](#)

23. Lemes LG, Corrêa TS, Fiaccadori FS, Cardoso Dd, Arantes Ade M, Souza KM, et al. (2014) Prospective study on Norovirus infection among allogeneic stem cell transplant recipients: prolonged viral excretion and viral RNA in the blood. *Clin Virol* 61:329–33.
24. Fumian TM, Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, Siqueira JA, Soares LS, et al. (2012) Detection of a novel recombinant strain of norovirus in an African-descendant community from the Amazon region of Brazil in 2008. *Arch Virol* 157:2389–92. doi: [10.1007/s00705-012-1428-2](https://doi.org/10.1007/s00705-012-1428-2) PMID: [22872050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22872050/)
25. Beuret C, Kohler D, Baumgartner A, Lüthi TM. Norwalk-like viruses sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands (2002) *Apl Environ Microbiol* 68: 1925–31.
26. Kojima S, Kaheyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, et al. (2002) Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Vir Methods* 100: 107–14.
27. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98.
28. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–9. doi: [10.1093/molbev/mst197](https://doi.org/10.1093/molbev/mst197) PMID: [24132122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132122/)
29. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al. (1999) Fulllength human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73:152–160. PMID: [9847317](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9847317/)
30. Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1: vev003.
31. Sang S, Zhao Z, Suo J, Xing Y, Jia N, Gao Y, et al. (2014) Report of recombinant norovirus GII.g/GII.12 in Beijing, China. *PLoS One* 9:e88210. doi: [10.1371/journal.pone.0088210](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088210) PMID: [24505432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24505432/)
32. Giammanco GM, Rotolo V, Medici MC, Tummolo F, Bonura F, Chezzi C, et al. (2012) Recombinant norovirus GII.g/GII.12 gastroenteritis in children. *Infect Genet Evol* 12:169–74. doi: [10.1016/j.meegid.2011.10.021](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.021) PMID: [22067516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22067516/)
33. Eden JS, Bull RA, Tu E, McIver CJ, Lyon MJ, Marshall JA, et al. (2010). Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008. *J Clin Virol* 49:265–271. doi: [10.1016/j.jcv.2010.09.001](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.09.001) PMID: [20888289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20888289/)
34. Mans J, Murray TY, Taylor MB (2014) Novel norovirus recombinants detected in South Africa. *Viol J* 11:168. doi: [10.1186/1743-422X-11-168](https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-168) PMID: [25228444](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25228444/)
35. Fajardo Á, Tort FL, Victoria M, Fumian TM, Miagostovich MP, Leite JP, et al. (2014) Phylogenetic analyses of Norovirus strains detected in Uruguay reveal the circulation of the novel GII.P7/GII.6 recombinant variant. *Infect Genet Evol* 28:328–32. doi: [10.1016/j.meegid.2014.10.026](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.026) PMID: [25445648](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25445648/)
36. Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM, 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:e33754. doi: [10.1371/journal.pone.0033754](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033754) PMID: [22448271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22448271/)
37. Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, Vieira CB, Xavier Mda P, Leite JP, et al. (2011) Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106:942–47. PMID: [22241115](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22241115/)
38. Barreira DM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadovsky AD, Leite JP, et al. (2010) Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J Clin Virol* 47:60–4. doi: [10.1016/j.jcv.2009.11.012](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.11.012) PMID: [20004146](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20004146/)
39. Huynen P, Mauroy A, Martin C, Savadogo LG, Boreux R, Thiry E, et al. (2013) Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *J Clin Virol* 58:515–521. doi: [10.1016/j.jcv.2013.08.013](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.08.013) PMID: [24029685](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24029685/)
40. Medici MC, Tummolo F, Martella V, Giammanco GM, De Grazia S, Arcangeletti MC, et al. (2014) Novel recombinant GII.P16_GII.13 and GII.P16_GII.3 norovirus strains in Italy. *Virus Res* 188:142–5. doi: [10.1016/j.virusres.2014.04.005](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.04.005) PMID: [24751799](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24751799/)
41. Puustinen L, Blazevic V, Salminen M, Hamalainen M, Rasanen S, Vesikari T (2011) Noroviruses as a major cause of acute gastroenteritis in children in Finland, 2009–2010. *Scand J Infect Dis* 43:804–808. doi: [10.3109/00365548.2011.588610](https://doi.org/10.3109/00365548.2011.588610) PMID: [21696253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21696253/)
42. Wu X, Han J, Chen L, Xu D, Shen Y, Zha Y, et al. (2015) Prevalence and genetic diversity of noroviruses in adults with acute gastroenteritis in Huzhou, China, 2013–2014. *Arch Virol* 160:1705–13. doi: [10.1007/s00705-015-2440-0](https://doi.org/10.1007/s00705-015-2440-0) PMID: [25951970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25951970/)
43. Yu Y, Yan S, Li B, Pan Y, Wang Y (2014) Genetic diversity and distribution of human norovirus in China (1999–2011). *Biomed Res Int* 2014:196169. doi: [10.1155/2014/196169](https://doi.org/10.1155/2014/196169) PMID: [24672783](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24672783/)
44. Zeng M, Gong Z, Zhang Y, Zhu Q, Wang X (2011) Prevalence and genetic diversity of norovirus in outpatient children with acute diarrhea in Shanghai, China. *Jpn J Infect Dis* 64:417–422. PMID: [21937824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21937824/)

45. Takanashi S, Wang Q, Chen N, Shen Q, Jung K, Zhang Z, et al. (2011) Characterization of emerging GII.g/GII.12 noroviruses from a gastroenteritis outbreak in the United States in 2010. *J Clin Microbiol* 49: 3234–3244. doi: [10.1128/JCM.00305-11](https://doi.org/10.1128/JCM.00305-11) PMID: [21752978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21752978/)
46. Vega E, Vinje J (2011) Novel GII.12 norovirus strain, United States, 2009–2010. *Emerg Infect Dis* 17:1516–1518. doi: [10.3201/eid1708.110025](https://doi.org/10.3201/eid1708.110025) PMID: [21801639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21801639/)
47. Mathijs E, Denayer S, Palmeira L, Botteldoorn N, Scipioni A, Vanderplasschen A, et al. (2011) Novel norovirus recombinants and of GII.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium. *Virology* 42: 310. doi: [10.1016/j.virus.2011.08.010](https://doi.org/10.1016/j.virus.2011.08.010) PMID: [21682917](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21682917/)
48. Han TH, Kim CH, Chung JY, Park SH, Hwang ES (2011) Emergence of norovirus GII-4/2008 variant and recombinant strains in Seoul, Korea. *Arch Virol* 156:323–9. doi: [10.1007/s00705-010-0844-4](https://doi.org/10.1007/s00705-010-0844-4) PMID: [21053029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21053029/)
49. Lim KL, Eden JS, Oon LL, White PA (2013) Molecular epidemiology of norovirus in Singapore, 2004–2011. *J Med Virol* 85:1842–51. doi: [10.1002/jmv.23669](https://doi.org/10.1002/jmv.23669) PMID: [23868077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23868077/)
50. van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, Hewitt J, et al. (2013) NoroNet. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill* 18:8–9. PMID: [23305715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23305715/)
51. Chan MC1, Chan PK (2013) Complete Genome Sequence of a Novel Recombinant Human Norovirus Genogroup II Genotype 4 Strain Associated with an Epidemic during Summer of 2012 in Hong Kong. *Genome Announc* 1pii: e00140–12.
52. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013) Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2009–2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 62(3): 41–7.
53. de Graaf M, van Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F, et al. (2015) Emergence of a novel GII.17 norovirus—End of the GII.4 era? *Euro Surveill* 20: 21178. PMID: [26159308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26159308/)
54. Nahar S, Afrad MH, Matthijnssens J, Rahman MZ, Momtaz Z, Yasmin R, et al. (2013) Novel intergenotype human norovirus recombinant GII.16/GII.3 in Bangladesh. *Infect Genet Evol* 20:325–9. doi: [10.1016/j.meegid.2013.09.021](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.09.021) PMID: [24080167](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24080167/)

4.2- Detection and molecular characterization of emergent GII.P17/GII.17 Norovirus in Brazil, 2015

Infection, Genetics and Evolution 51 (2017) 28–32



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid



Research paper

Detection and molecular characterization of emergent GII.P17/GII.17 Norovirus in Brazil, 2015



Juliana S.R. Andrade ^{a,*}, Tulio M. Fumian ^{a,1}, José Paulo G. Leite ^a, Matheus R. de Assis ^b, Gonzalo Bello ^a, Daiana Mir ^a, Marize P. Miagostovich ^a

^a Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

^b State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Objetivo:

-2. Caracterizar a introdução da variante emergente do genótipo GII.P17-GII-17 Kawasaki_2014 no Brasil em 2015 por estudos filogenéticos e de filogeografia;



Research paper

Detection and molecular characterization of emergent GII.P17/GII.17 Norovirus in Brazil, 2015



Juliana S.R. Andrade ^{a,*}, Tulio M. Fumian ^{a,1}, José Paulo G. Leite ^a, Matheus R. de Assis ^b, Gonzalo Bello ^a, Daiana Mir ^a, Marize P. Miagostovich ^a

^a Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

^b State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2017

Received in revised form 9 March 2017

Accepted 10 March 2017

Available online 11 March 2017

Keywords:

Norovirus

GII.17 variant

Molecular characterization

Phylogenetic analysis

Brazil

ABSTRACT

A newly GII.17 Kawasaki_2014 variant strain was detected recently in Brazil. Phylogenetic analysis reveals at least four independent introduction events of this lineage into this country that took place throughout 2014, coinciding with FIFA World Cup in Brazil, 2014, and Hong Kong has been identified as the most likely source of introduction. This variant emerged in Asia causing outbreaks and replacing prevalent GII.4. Emergence of GII.P17/GII.17 variant emphasizes the need for active laboratory surveillance for NoV including molecular epidemiology and studies on virus evolution.

© 2017 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Noroviruses (NoV), members of *Caliciviridae* family, are a major cause of viral gastroenteritis causing almost 50% of acute gastroenteritis (AGE) outbreaks. Over 90% of non-bacterial AGE worldwide are primarily associated with AGE outbreaks in semi-closed settings (Patel et al., 2008; Green, 2013). In developing countries they are associated to cause up to 200,000 deaths of children <5 years of age (Patel et al., 2008).

NoV RNA genome contains three open reading frames (ORFs). ORF1 encodes non-structural proteins including RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), while ORF2 and ORF3 encode the major capsid VP1 protein, and a minor structural VP2 protein, respectively (Green, 2013). According to the amino acid sequence of VP1 protein, NoV are classified into six genogroups (GI–GVI) and further divided into 36 genotypes recognized to date (Zheng et al., 2006; Kroneman et al., 2013). Despite its high genetic diversity, a single genotype (GII.4) is responsible for the most AGE outbreaks caused by NoV worldwide since the 90's decade (van Beek et al., 2013). Due to two major evolution mechanisms – genome recombination and mutations – new GII.4 variants emerged every two/three years with ability to re-infect individuals previously exposed (Bull and White, 2011; White, 2014).

A new GII.17 variant, named Kawasaki_2014, containing an ORF1 genotype (GII.P17) that had not yet been detected, however it was recently detected in China in association with increased number of AGE outbreaks reported in this country. This novel variant replaced previous dominant GII.4 Sidney_2012 (Lu et al., 2015) with rapid spreading to other Asian Countries (Chan et al., 2015; Matsushima et al., 2015; Khamrin et al., 2016; Dang Thanh et al., 2016). In addition, it was recently detected in Europe (Italy and Romania) and North America (USA and Canada) (Parra and Green, 2015; Medici et al., 2015; Dinus et al., 2016; LeBlanc et al., 2016). In Latin America, this virus was detected in cases of AGE outbreak in Argentinean samples of children and adults, and in pediatric inpatients in the northern region of Brazil (Degiuseppe et al., 2017; Silva et al., 2017). By phylogenetic analysis, emergent GII.P17/GII.17 strains have formed a segregated cluster named cluster C, and further subdivided in subcluster C-I and C-II. Here, we report detection and molecular characterization of this novel variant in 2015 in different states of Brazil. We characterized the full-length capsid gene of six strains circulating in Brazil, and by phylogenetic and molecular clock analyses, we also estimated the introduction of this variant in our country.

2. Material and methods

In Brazil, AGE surveillance is performed through network where samples are provided by medical request in hospitals and health centers and monitored by the Brazilian Unified Health System. Fecal samples are collected systematically by the State Central Laboratory and then forwarded to the Laboratory of Comparative and Environmental

* Corresponding author at: Oswaldo Cruz Institute – Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, CEP: 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: juliana@ioc.fiocruz.br (J.S.R. Andrade).

¹ These authors contributed equally to this article.

Virology at Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Ministry of Health. Procedures are approved by Fiocruz Ethical Committee (No. 311/06). NoV screening was performed by RT-qPCR using primers and probe targeting ORF1/2 junction (Kageyama et al., 2003).

From May through September 2015, we detected NoV in 28% (51/178) of stool samples from outpatients with AGE received for diagnosis. For virus characterization, NoV-positive samples, randomly selected, amplification was carried out using One-Step RT-PCR kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) with Mon431 and G2SKR primers (557 bp) targeting ORF1/2 junction region (Kojima et al., 2002 and Beuret et al., 2002). Sequencing was performed using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on an automated sequencer ABI Prism 3130xl DNA Sequencer (Applied Biosystems), and genotype was assigned using Norovirus Automated Genotyping Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>). During this period, we detected six NoV strains classified as GII.P17/GII.17 from children under two years of age (four samples) and adults (two samples) from three distinct Brazilian States – Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

A phylogenetic dendrogram was constructed based on partial 5'-end of ORF2 region by neighbor-joining method using a matrix of genetic distances established under Kimura-two parameter model using MEGA v.6 (Tamura et al., 2013). For further genetic characterization of Brazilian strains, we amplified the nearly full-length complete genome of two samples (KY392867 and KY392868), and the full-length ORF2

of the other four samples using RT-PCR and six primer pairs, as previously described (Xue et al., 2016). Sequences deposited into GenBank database are under accession no. KY397953–KY397958.

All NoV GII.17 ORF2 sequences available on GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) with known sampling date and location were downloaded in August 2016, and combined with previously identified GII.17 ORF2 sequences from Brazil ($n = 287$). Sequences were subjected to Maximum likelihood (ML) phylogenetic analysis implemented in PhyML 3.0 program under GTR + I + Γ 4 nucleotide substitution model as determined by ModelGenerator v0.851.

In order to characterize the origin of NoV GII.17 Kawasaki_2014 strains detected in Brazil, a Bayesian coalescent-based analysis was performed in BEAST v1.8.3 package (Drummond and Rambaut, 2007). All ORF2 GII.17 sequences belonging to GII.17 Kawasaki cluster were analyzed using a Bayesian Skyline Plot (BSP) coalescent tree prior and uncorrelated lognormal molecular clock model with uniform prior on the clock rate ($3.76\text{--}7.87 \times 10^{-3}$, initial value: 5.68×10^{-3} , subs./site/year) based on estimations reported previously (Lu et al., 2015). Both reversible and non-reversible discrete diffusion models were tested in each country used as discrete state, except for Chinese and Brazilian sequences assigned to discrete locations at a local level (5 Chinese Province/Municipality/Administrative and 3 Brazilian State locations). Model fit was evaluated using (log) marginal likelihood estimates obtained through path sampling (PS) (Lartillot and Philippe, 2006) and stepping-stone sampling (SS) (Xie et al., 2011) methods.



Fig. 1. Maximum likelihood phylogeny of norovirus GII.P17/GII.17 complete ORF2 region sequences implemented in PhyML 3.0 under the GTR + I + Γ 4 nucleotide substitution model, determined by ModelGenerator v0.851. GII-17 clusters are represented for A–C and subclusters are represented for C-I (pre-epidemic Kawasaki) and C-II (Kawasaki_2014). Analysis includes six Brazilian strains that grouped within subcluster C-II (pre-epidemic Kawasaki).

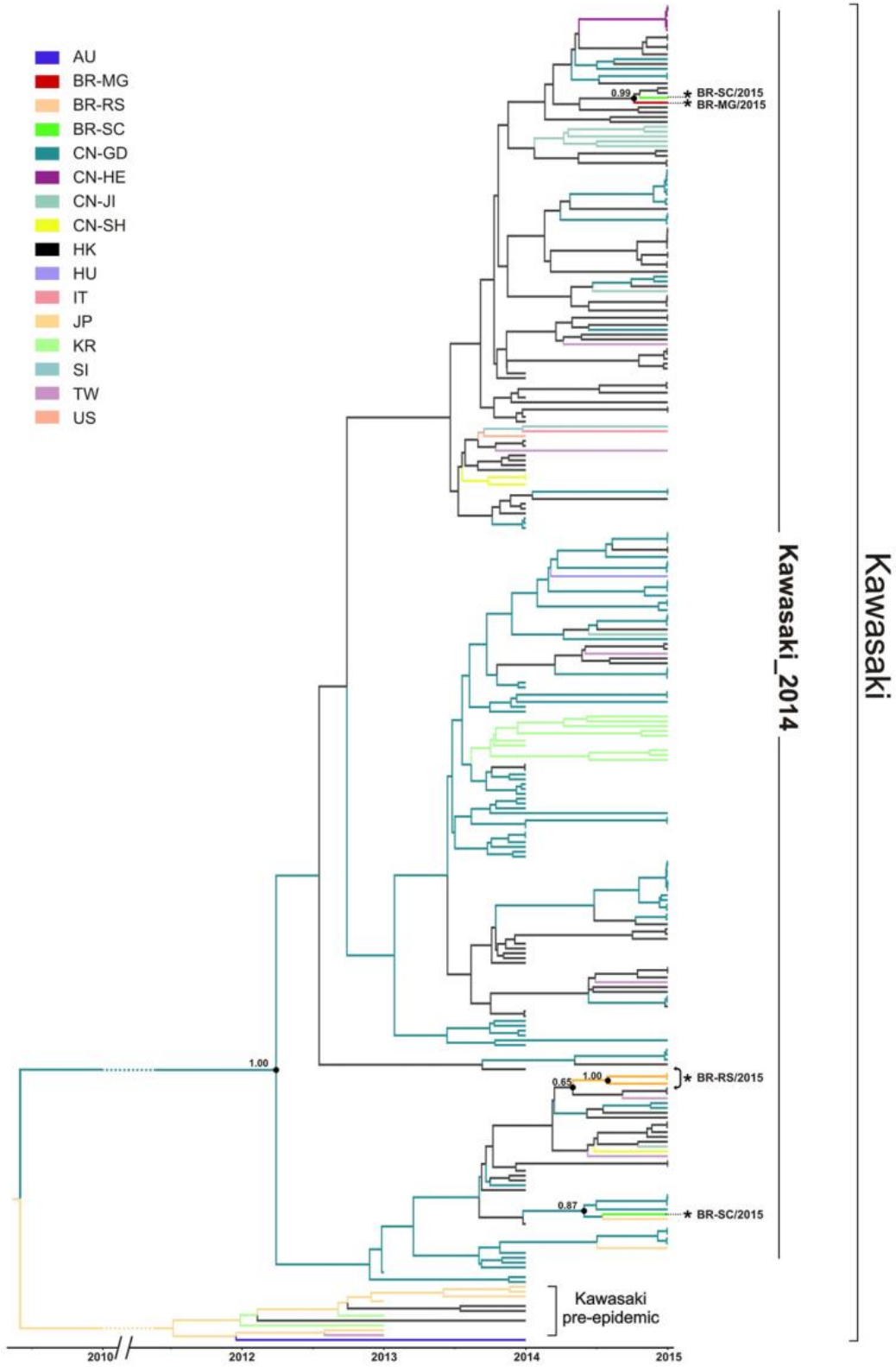


Fig. 2. Molecular clock phylogeny of norovirus GII.17 Kawasaki_2014 strains obtained with Bayesian Markov chain Monte Carlo method of full-length ORF2 sequences. All six Brazilian strains are indicated by asterisks and properly identified.

3. Results and discussion

Brazilian samples grouped within subcluster C-II, represented by the most recent emergent GII.P17/GII.17 strains, detected in China and Hong Kong during 2014 and 2015, as well as strains detected outside Asia, such as North American and Italian strains (Fig. 1). In Brazil, genetically distinct GII.17 strains detected in 2005 and 2006, were grouped into clusters A and B. Some of these strains were also ORF1 genotyped and displayed different recombination patterns between clusters A and B, in line with previously strains characterized elsewhere (Parra and Green, 2015; Fumian et al., 2016). During 2004–2005, genetically similar GII.17 strains belonging to clusters A and B also circulated in Paraguay, a Brazilian neighboring country (Galeano et al., 2013).

As for ORF2 sequence, six Brazilian strains showed a high nt identity (>99%) and amino acid (aa) divergence lower than 1.2% among C-II strains, such as Kawasaki308/JP/2015, Guangzhou/CHN/2014, PR668/ITA/2015, and Gaithersburg/US/2014. Comparing with strains belonging to subcluster C-I (Saitama5203/JP/2013 and Kawasaki323/JP/2014), nt identity ranged from 95.6% to 96.1%, and aa divergence ranged from 4.8 to 5.2%, with two aa insertions, as previously demonstrated (Matsushima et al., 2015; Parra and Green, 2015; Medici et al., 2015). None aa changes displayed by Brazilian strains were located in P2 domain (epitopes I–V).

As supported by earlier studies (Lu et al., 2015; Parra and Green, 2015; Dang Thanh et al., 2016), ML phylogenetic reconstruction shows that NoV GII.17 strains branch into three highly supported (aLRT \geq 0.99) lineages (I, II, Kawasaki) (Fig. 2). Further Kawasaki lineage diversification led to two subclusters: Kawasaki_pre-epidemic (aLRT = 0.73) containing strains isolated during 2013/2014; and Kawasaki_2014 (aLRT = 0.95) encompassing isolates sampled in 2014/2015 alongside one sequence from 2013. All Brazilian sequences clustered within the novel GII.17 Kawasaki_2014 lineage. These results are similar to previous study conducted in the northern region of Brazil, where phylogenetic analysis of ORF1/2 junction region showed that Brazilian strains grouped into subcluster C-II, presenting high identity (>99%) with strains Kawasaki308/JP/2015, Guangzhou/CHN/2014, PR668/ITA/2015, and Gaithersburg/US/2014. In addition, our results are in line with Degiuseppe et al. (2017) that consider Argentinean GII.17 strain grouped within cluster C, but as external to the main group.

The non-reversible phylogeographic model was selected as the best fit (log BF \geq 3.6) and supports that the origin of variant Kawasaki_2014 occurred in Guangdong-China (posterior state probability [PSP] = 0.84) at around 2012 (95% HPD: 2012–2013). Branch distribution of Brazilian strains inside Kawasaki_2014 lineage is consistent with at least four independent introduction events of this lineage into this country that took place throughout 2014. Hong Kong was identified as the most probable source of GII.17 Kawasaki_2014 strains introduction in Santa Catarina, Rio Grande do Sul and Minas Gerais (PSP \geq 0.83). Phylogeographic inference also supports a second introduction of GII.17 Kawasaki_2014 lineage in Santa Catarina that likely arose in Guangdong-China (PSP = 0.46).

4. Conclusions

The present study describes the first detection of emergent variant GII.P17/GII.17 circulating in Brazil in 2015, detected firstly in Asia in 2014 and then in other countries. Rapid evolution, spread and prevalence of this variant can be compared with epidemiological GII.4 trends along the years.

We demonstrated here by phylogenetic and molecular clock analyses that Brazilian strains belong to subcluster C-II, resulted from at least four independent introductions in the country, most likely from Hong Kong.

The estimated date of origin of this variant (2014) coincides with the peak of international tourism driven by FIFA World Cup event, occurred almost a year before detection of GII.17 in Brazil, reinforcing the

importance of norovirus epidemiological surveillance. With detection of this new variant in Brazil, studies on characterization and surveillance of NoV are important to maintain investigation in AGE cases and outbreaks. NoV is capable of dispersing globally, and in this way, monitoring of GII.17 is relevant.

Funding

This work was supported by Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State of Rio de Janeiro (Faperj). DM was funded by a fellowship from Coordination of Personal Improvement of Higher Education (CAPES) and National Agency for Research and Innovation (A.N.I.I.).

Acknowledgments

The authors thank Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State of Rio de Janeiro (Faperj). MPM and JPG Leite are Research Productivity fellowships of CNPq/Faperj.

References

- Beuret, C., Kohler, D., Baumgartner, A., Lüthi, T.M., 2002. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one year monitoring of three brands. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1925–1931.
- Bull, R.A., White, P.A., 2011. Mechanisms of GII.4 evolution. *Trends Microbiol.* 19, 233–240.
- Chan, M.C., Lee, N., Hung, T.N., Kwok, K., Cheung, K., Tin, E.K., Lai, R.W., Nelson, E.A., Leung, T.F., Chan, P.K., 2015. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nat. Commun.* 6, 10061.
- Dang Thanh, H., Than, V.T., Nguyen, T.H., Lim, I., Kim, W., 2016. Emergence of norovirus GII.17 variants among children with acute gastroenteritis in South Korea. *PLoS One* 11, e0154284.
- Degiuseppe, J.J., Gomes, K.A., Hadad, M.F., Parra, G.I., Stupka, J.A., 2017. Detection of novel GII.17 norovirus in Argentina, 2015. *Infect. Genet. Evol.* 47, 121–124.
- Dinus, S., Nagy, M., Negru, D.G., Popovici, E.D., Zota, L., Oprisan, G., 2016. Molecular identification of emergent GII.P17-GII.17 norovirus genotype, Romania, 2015. *Euro. Surveill.* 21, 30141.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.
- Fumian, T.M., da Silva Ribeiro de Andrade, J., Leite, J.P., Miagostovich, M.P., 2016. Norovirus recombinant strains isolated from gastroenteritis outbreaks in Southern Brazil, 2004–2011. *PLoS One* 11, e0145391.
- Galeano, M.E., Martinez, M., Amarilla, A.A., Russomando, G., Miagostovich, M.P., Parra, G.I., Leite, J.P., 2013. Molecular epidemiology of norovirus strains in Paraguayan children during 2004–2005: description of a possible new GII.4 cluster. *J. Clin. Virol.* 58, 378–384.
- Green, K., 2013. Caliciviridae: the noroviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, sixth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 582–608.
- Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K., 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1548–1557.
- Khamrin, P., Kumthip, K., Yodmeeklin, A., Supadej, K., Ukarapol, N., Thongprachum, A., Okitsu, S., Hayakawa, S., Ushijima, H., Maneekarn, N., 2016. Molecular characterization of norovirus GII.17 detected in healthy adult, intussusception patient, and acute gastroenteritis children in Thailand. *Infect. Genet. Evol.* 44, 330–333.
- Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N., Katayama, K., 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods* 100, 107–114.
- Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., Koopmans, M., 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch. Virol.* 158, 2059–2068.
- Lartillot, N., Philippe, H., 2006. Computing Bayes factors using thermodynamic integration. *Syst. Biol.* 55, 195–207.
- LeBlanc, J.J., Pettipas, J., Gaston, D., Taylor, R., Hatchette, T.F., Booth, T.F., Mandes, R., McDermid, A., Grudeski, E., 2016. Outbreak of Norovirus GII.P17-GII.17 in the Canadian province of Nova Scotia. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2016, 1280247.
- Lu, J., Sun, L., Fang, L., Yang, F., Mo, Y., Lao, J., Zheng, H., Tan, X., Lin, H., Rutherford, S., Guo, L., Ke, C., Hui, L., 2015. Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1240–1242.
- Matsushima, Y., Ishikawa, M., Shimizu, T., Komane, A., Kasuo, S., Shinohara, M., Nagasawa, K., Kimura, H., Ryo, A., Okabe, N., Haga, K., Doan, Y.H., Katayama, K., Shimizu, H., 2015. Genetic analyses of GII.17 norovirus strain in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro. Surveill.* 20, 21173.

- Medici, M.C., Tummolo, F., Calderaro, A., Chironna, M., Giammanco, G.M., De Grazia, S., Arcangeletti, M.C., De Conto, F., Chezzi, C., Martella, V., 2015. Identification of the novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy, 2015. *Euro Surveill.* 20 (35), 30010.
- Parra, G.I., Green, K.Y., 2015. Genome of emerging norovirus GII.17, United States, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1477–1479.
- Patel, M.M., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Akazawa, K., Vinjé, J., Parashar, U.D., 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1224–1231.
- Silva, L.D., Bandeira, R.D., Junior, E.C., Lima, I.C., da Penha Júnior, E.T., Teixeira, D.M., Siqueira, J.A., Resque, H.R., de Abreu Campos, E.M., Justino, M.C., Linhares, A.C., Gabbay, Y.B., 2017. Detection and genetic characterization of the emergent GII.17_2014 norovirus genotype among children with gastroenteritis from Northern Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 48, 1–3.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. *Mega6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0*. *Mol. Biol. Evol.* 302725–9.
- van Beek, J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Eden, J.S., Fonager, J., Hewitt, J., Iritani, N., Kroneman, A., Vennema, H., Vinjé, J., White, P.A., Koopmans, M., 2013. NoroNet. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype GII.4, late 2012. *Euro Surveill.* 18, 8–9.
- Xie, W., Lewis, P.O., Fan, Y., Kuo, L., Chen, M.H., 2011. Improving marginal likelihood estimation for Bayesian phylogenetic model selection. *Syst. Biol.* 60, 150–160.
- Xue, L., Cai, W., Wu, Q., Zhang, J., Guo, W., 2016. Direct sequencing and analysis of the genomes of newly emerging GII.17 norovirus strains in South China. *J. Appl. Microbiol.* 120, 1130–1135.
- Zheng, D.P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312–323.
- White, P.A., 2014. Evolution of norovirus. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 741–745.

4.3- Norovirus GII.17 Associated with a Foodborne Acute Gastroenteritis Outbreak in Brazil, 2016

Food and Environmental Virology
<https://doi.org/10.1007/s12560-017-9326-0>

BRIEF COMMUNICATION



Norovirus GII.17 Associated with a Foodborne Acute Gastroenteritis Outbreak in Brazil, 2016

Juliana da Silva Ribeiro de Andrade¹ · Tulio Machado Fumian¹ · José Paulo Gagliardi Leite¹ ·
Matheus Ribeiro de Assis² · Alexandre Madi Fialho¹ · Sergio Mouta¹ · Cristiane Mendes Pereira Santiago³ ·
Marize Pereira Miagostovich¹

Objetivo:

- 3. Investigar a associação da variante GII.17 Kawasaki_2014 ao surto de GA de transmissão alimentar ocorrido em 2016;



Norovirus GII.17 Associated with a Foodborne Acute Gastroenteritis Outbreak in Brazil, 2016

Juliana da Silva Ribeiro de Andrade¹ · Tulio Machado Fumian¹ · José Paulo Gagliardi Leite¹ · Matheus Ribeiro de Assis² · Alexandre Madi Fialho¹ · Sergio Mouta¹ · Cristiane Mendes Pereira Santiago³ · Marize Pereira Miagostovich¹

Received: 20 August 2017 / Accepted: 10 November 2017
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2017

Abstract

Foodborne transmission gastroenteritis (AGE) outbreak occurred during a celebration lunch in July, 2016, Brazil. All stool samples tested were positive for noroviruses (NoV) and phylogenetic analysis revealed that strains were genetically close to GII.17 Kawasaki_2014. These findings indicated circulation of NoV GII.17 Kawasaki_2014 in the Brazilian population, associated with AGE outbreak.

Keywords Norovirus · GII.17 Kawasaki_2014 · Foodborne transmission · Outbreak · Molecular characterization · Brazil

Introduction

Noroviruses (NoV) belong to the *Caliciviridae* family and are the most important viral pathogens associated with acute gastroenteritis (AGE) outbreaks of foodborne transmission (Green 2013, Patel et al. 2008).

NoVs genome are composed of a single-strand RNA with approximately 7.4 kb, positive-sense, organized into three open reading frames (ORFs). ORF-1 encodes non-structural proteins, including RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) and ORF-2 and ORF-3 encode structural capsid proteins VP1 and VP2, respectively (Green 2013).

NoVs are classified into seven genogroups (GI–GVII) according to the amino acid sequence of VP1 protein and can be divided into over 30 genotypes (Kroneman et al. 2013; Vinje 2015). NoV GII is most commonly associated with NoV infections worldwide and genotype GII.4 is recognized as the major cause of AGE outbreaks due to the emergence of new variants every 2–4 years, induced by evolution

mechanisms of recombination and mutations (Lindesmith et al. 2013).

Predominance of this genotype in NoV outbreaks was recently shattered by a recently emergent NoV GII.P17–GII.17, termed Kawasaki_2014. This new genotype emerged in Asia and spread rapidly in the continent, becoming predominant in different countries in 2015 and displacing previous dominant GII.4_Sydney 2012 (Chan et al. 2015; Lu et al. 2015; Matsushima et al. 2015; Dang et al. 2016; Khamrin et al. 2016). Since the end of 2014 this variant was reported in association with AGE outbreaks and sporadic cases worldwide (Medici et al. 2015; Parra and Green 2015; Dinus et al. 2016; Khamrin et al. 2016; LeBlanc et al. 2016; Huang et al. 2017; Jung et al. 2017). In Latin America, this emergent variant was detected in AGE outbreak in Argentina (Degiuseppe et al. 2017) and Brazil (Andrade et al. 2017; Silva et al. 2017).

Few studies reported NoV GII.17 involved in waterborne and foodborne transmission outbreaks in different countries, such as France (Sanchez et al. 2017), China (Qin et al. 2016), and Denmark (Rasmussen et al. 2016; Imamura et al. 2016; Pu et al. 2016; La Rosa et al. 2017).

In this study, we report detection of a NoV GII.P17–GII.17 outbreak associated with foodborne transmission during a celebration lunch in Brazil, 2016.

✉ Juliana da Silva Ribeiro de Andrade
juliana@ioc.fiocruz.br

¹ Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-900 Rio De Janeiro, RJ, Brazil

² State University of Rio de Janeiro, Rio De Janeiro, Brazil

³ State Central Laboratory, Minas Gerais, Brazil

Materials and Methods

This study was approved by Oswaldo Cruz Foundation Ethics Committee (No. 311/06) aiming at carrying out laboratory surveillance of AGE outbreaks or sporadic cases by identifying viral etiology according to demands from State Health Laboratories, Brazilian Ministry of Health.

AGE Outbreak

The Central Laboratory of Minas Gerais State (LACEN-MG) was requested to clarify an AGE outbreak that occurred after a celebration lunch carried out at Rotary Club of Iturama, Belo Horizonte city, MG, Brazil. The food served at the lunch were beef stroganoff, white rice, meatloaf, mashed potatoes, shoestring potatoes and a tropical salad with lettuce, cherry tomatoes, mango, rucula, and spices.

Epidemiological evaluations of this outbreak suggested foodborne transmission.

Laboratorial Investigation

Five stool samples of individuals who attended the lunch celebration and who presented symptoms the day after lunch were collected and sent for rotavirus A (RVA) and NoV investigation to the Laboratory of Comparative and Environmental Virology (LVCA) followed by a clinical form containing clinical information from each patient.

All samples were investigated for RVA and NoV by RT-qPCR using primers and probe targeting the NSP3 gene segment and ORF1/2 junction, respectively (Zeng et al. 2008; Kageyama et al. 2003). For virus characterization, positive samples were amplified using One-Step RT-PCR kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) with Mon431 and G2SKR primers (570 bp) targeting ORF1/2 junction region (Kojima et al. 2002 and Beuret et al. 2002). Sequencing was performed using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on ABI Prism 3130xl DNA Sequencer automated sequencer (Applied Biosystems), and genotype was assigned using the

Norovirus Automated Genotyping Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>). Sequences were deposited in GenBank database under accession number KY985368-72.

Phylogenetic dendrograms were constructed based on the ORF1 and ORF2 regions using the neighbor-joining method. A matrix of genetic distances was established using Kimura-two parameter model (Kimura 1980) employing MEGA v.7. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Kumar et al. 2016).

Results and Discussion

We detected NoV GII by RT-qPCR in 100% (5/5) of samples investigated. All patients presented more than two vomit episodes and two diarrhea episodes per day (Table 1).

Sequence analysis of ORF1 and ORF2 regions revealed that the genotype associated to the outbreak was emergent GII.P17-GII.17 Kawasaki_2014 strain (Figs. 1, 2).

The dendrograms constructed from ORF1 and ORF 2 regions were divided in cluster I, subcluster I, and cluster II. All sequences of strains of this study grouped on cluster I within the epidemic GII.17 Kawasaki_2014 lineage, including other Brazilian strains detected in 2015 (Silva et al. 2017) and strains detected in China, Hong Kong, Japan and countries outside Asia such as the USA and Italy. Subcluster I comprises strains that circulated between 2013 and 2014 in Asia, during the pre-epidemic period of NoV GII.17 Kawasaki_2014. The Argentinean strain clustered in Kawasaki_2014 lineage, however, is external to the main group, corroborating previous studies (Andrade et al. 2017; Degiuseppe et al. 2017). Cluster II contains older GII.17 strains isolated in 2002 and are not related to the epidemic strain, as well as the strain dating back to 1978. This finding indicates that NoV Brazilian strains detected in the foodborne outbreak are closely related to the epidemic GII.17 Kawasaki_2014 lineage.

In Brazil, emergent GII.P17-GII.17 was detected for the first time in samples of pediatric inpatients with AGE in 2016, Northern region of the country (Silva et al. 2017). A previous study carried out by our group, GII.P17-GII.17,

Table 1 Patient clinical information, outbreak characteristics, and sample viral quantification

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5
Gender/age	F/19	M/26	F/26	F/50	F/58
Days of collection after symptoms	1	1	1	1	2
No. of vomiting episode per day (No. of days)	8(1)	3(1)	9(1)	5(1)	3(1)
Diarrhea episodes per day (total days)	4(1)	4(2)	9(1)	3(1)	13(3)
Fever (≥ 37.5 °C)	No	No	No	No	No
Presence of blood in faeces	No	No	No	No	No
Viral load (CT-genome copies/gram)	19.4–1.08E+09	21.1–3.73E+08	22.1–1.99E+08	19.7–8.94E+08	21.1–3.73E+08

Fig. 1 Phylogenetic analysis of the partial nucleotide sequences encoding the ORF1 (RdRp) region (235 bp) of GII.17 NoVs. The tree was generated using the neighbor-joining algorithm and the Kimura 2-parameter model of nucleotide substitution was used, selected as the best-fit model in the MEGA v.7 software. The robustness of branching patterns was tested by 2000 bootstrap pseudoreplications. Scale bar indicates that nucleotide substitutions per site and bootstrap values (> 70) are indicated for the corresponding nodes. The NoV strains detected in the present study are presented with black dot symbol

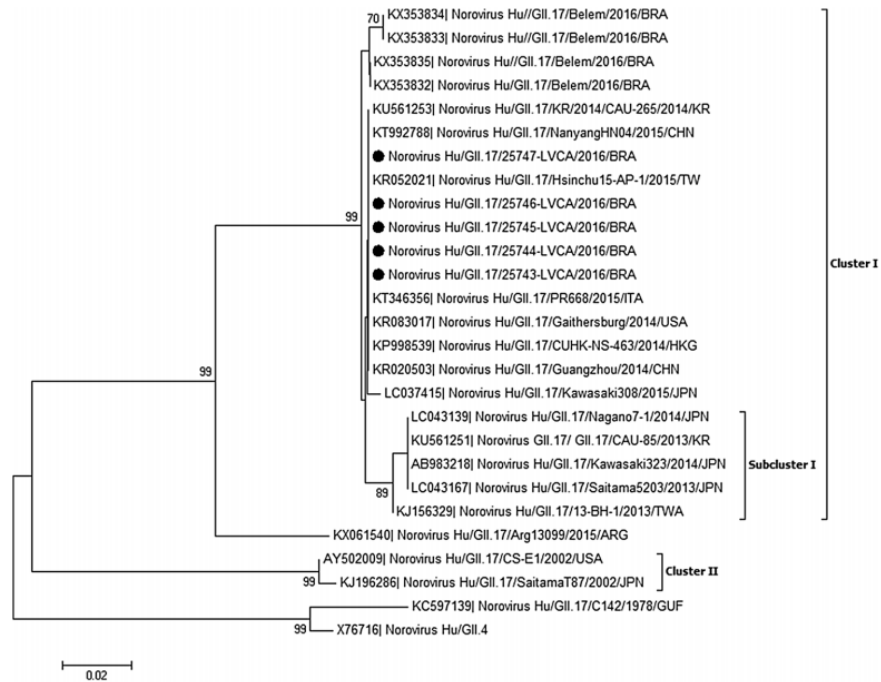
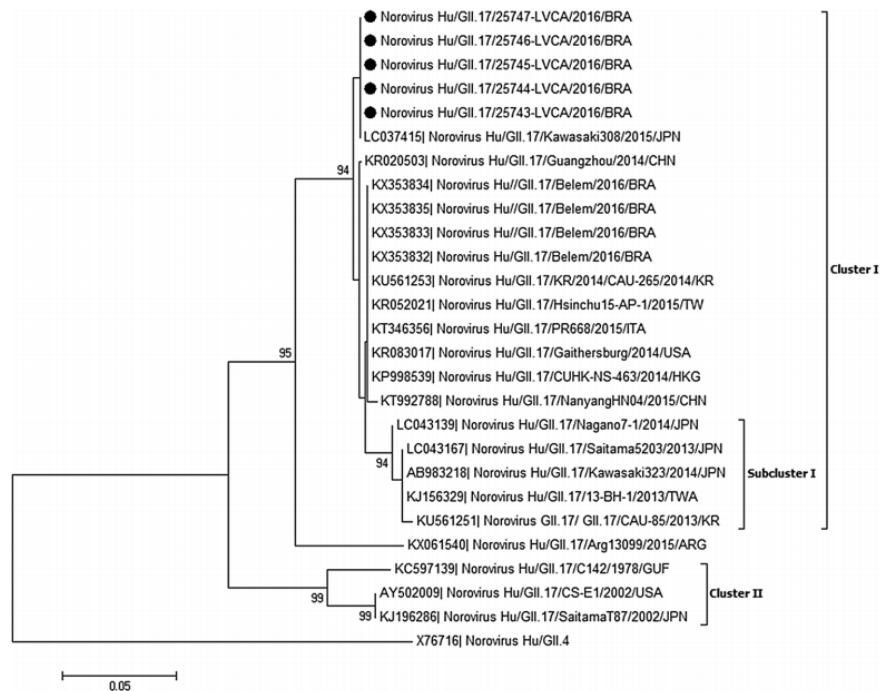


Fig. 2 Phylogenetic analysis of the partial nucleotide sequences encoding the ORF2 (casid) region (233 bp) of GII.17 NoVs. The tree was generated using the neighbor-joining algorithm, and the Kimura 2-parameter model of nucleotide substitution was used, selected as the best-fit model in the MEGA v.7 software. The robustness of branching patterns was tested by 2000 bootstrap pseudoreplications. Scale bar indicates that nucleotide substitutions per site and bootstrap values (> 70) are indicated for the corresponding nodes. The NoV strains detected in the present study are presented with black dot symbol



was detected from samples collected from sporadic cases of children and adults with AGE in 2015, enabling us to estimate the introduction of this strain in Brazil. Bayesian analysis of the entire ORF2 estimated that the introduction

date could have occurred in mid-2014 and Hong Kong was pointed as the most probable source of these viruses in Brazil (Andrade et al. 2017). Also in Latin America, NoV GII.17 was described in Argentina in 2015, associated with

a case from a child with AGE closely related with cluster C Kawasaki_2014 (Degiuseppe et al. 2017).

Foodborne transmission is the leading route of NoV infection. Few studies have reported detection of this variant in water and shellfish (Imamura et al. 2016; La Rosa et al. 2017). In Japan, GII.17_Kawasaki was the predominant genotype found in oysters (Pu et al. 2016), and in Denmark it was associated with AGE outbreak transmitted by oyster consumption (Rasmussen et al. 2016). A large foodborne AGE outbreak in a French military unit was associated with NoV GII.17_Kawasaki (Sanchez et al. 2017). In Brazil, two studies that reported foodborne AGE outbreaks which occurred in cruise ships pointed NoV GII as the etiological agent (Morillo et al. 2012, Morillo et al. 2017).

Our study has some limitations mainly concerning restricted information about the outbreak. No type of food was collected, so we could not investigate NoV's presence on food matrix in order to link results with clinical samples. Moreover, it was not possible to access other patients and food handlers to investigate epidemiological aspects of the outbreak, such as previous AGE symptoms, type of dishes consumed, and the secondary attack rate.

Our finding shows that NoV GII.17 Kawasaki_2014 is linked with a foodborne transmission AGE outbreak which occurred during a celebration lunch, where dishes containing several uncooked ingredients were served. It is likely that the outbreak could have been caused by contaminated food or inadequate manipulation, highlighting the importance of prevention measures such as adequate personal hygiene, restricting food handlers with AGE symptoms from working, and proper environmental disinfection. These results are essential for public health, emphasizing the importance of a systematic surveillance, supporting the implementation of prevention and control strategies as well a better understanding of NoV GII.17 evolution.

Acknowledgements The authors thank Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, State Central Laboratory (LACEN-MG), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State of Rio de Janeiro (Faperj). MPM and JPG Leite are Research Productivity fellowships of CNPq/Faperj.

Funding This work was supported by Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State of Rio de Janeiro (Faperj).

References

- Andrade, J. S. R., Fumian, T. M., Leite, J. P. G., Assis, M. R., Bello, G., Mir, D., et al. (2017). Detection and molecular characterization of emergent GII.P17/GII.17 Norovirus in Brazil, 2015. *Infection, Genetics and Evolution*, *51*, 28–32.
- Beuret, C., Kohler, D., Baumgartner, A., & Lüthi, T. M. (2002). Norwalk-like virus sequences in mineral waters: One year monitoring of three brands. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 1925–1931.
- Chan, M. C., Lee, N., Hung, T. N., Kwok, K., Cheung, K., Tin, E. K., et al. (2015). Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nature Communications*, *6*, 10061.
- Dang, Thanh H., Than, V. T., Nguyen, T. H., Lim, I., & Kim, W. (2016). Emergence of norovirus GII.17 variants among children with acute gastroenteritis in South Korea. *PLoS ONE*, *11*, e0154284.
- Degiuseppe, J. I., Gomes, K. A., Hadad, M. F., Parra, G. I., & Stupka, J. A. (2017). Detection of novel GII.17 norovirus in Argentina, 2015. *Infection, Genetics and Evolution*, *47*, 121–124.
- Dinus, S., Nagy, M., Negru, D. G., Popovici, E. D., Zota, L., & Oprisan, G. (2016). Molecular identification of emergent GII.17-GII.17 norovirus genotype, Romania, 2015. *EuroSurveillance*, *21*(7), 30141.
- Green, K. Y. (2013). Caliciviridae: The noroviruses. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields virology* (6th ed., pp. 949–979). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins.
- Huang, X. Y., Su, J., Lu, Q. C., Li, S. Z., Zhao, J. Y., Li, M. L., et al. (2017). A large outbreak of acute gastroenteritis caused by the human norovirus GII.17 strain at a university in Henan Province, China. *Infectious Diseases of Poverty*, *6*(1), 6.
- Imamura, S., Haruna, M., Goshima, T., Kanezashi, H., Okada, T., & Akimoto, K. (2016). Application of next-generation sequencing to investigation of norovirus diversity in shellfish collected from two coastal sites in Japan from 2013 to 2014. *Japanese Journal of Veterinary Research*, *64*(2), 113–122.
- Jung, S., Hwang, B. M., Jung, H., Chung, G., Yoo, C. K., & Lee, D. Y. (2017). Emergence of norovirus GII.17-associated outbreak and sporadic cases in Korea from 2014 to 2015. *Osong Public Health and Research Perspectives*, *8*(1), 86–90.
- Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., et al. (2003). Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*, 1548–1557.
- Khamrin, P., Kumthip, K., Yodmeeklin, A., Supadej, K., Ukarapol, N., Thongprachum, A., et al. (2016). Molecular characterization of norovirus GII.17 detected in healthy adult, intussusception patient, and acute gastroenteritis children in Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, *44*, 330–333.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*, 111–120.
- Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Shinohara, M., Uchida, K., et al. (2002). Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *Journal of Virology Methods*, *100*, 107–114.
- Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinje, J., White, P. A., Hansman, G., et al. (2013). Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of Virology*, *158*(10), 2059–2068.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*, 1870–1874.
- La Rosa, G., Della Libera, S., Iaconelli, M., Proroga, Y. T., De Medici, D., Martella, V., et al. (2017). Detection of norovirus GII.17 Kawasaki 2014 in shellfish, marine water and underwater sewage discharges in Italy. *Food and Environmental Virology*. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9290-8>.
- LeBlanc, J. J., Pettipas, J., Gaston, D., Taylor, R., Hachette, T. F., Booth, T. F., et al. (2016). Outbreak of Norovirus GII.P17-GII.17 in the Canadian Province of Nova Scotia. *Canadian Journal*

- of *Infectious Diseases and Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2016/1280247>.
- Lindesmith, L. C., Costantini, V., Swanstrom, J., Debbink, K., Donaldson, E. F., Vinjé, J., et al. (2013). Emergence of a norovirus GII.4 strain correlates with changes in evolving blockade epitopes. *Journal of Virology*, 87(5), 2803–2813.
- Lu, J., Sun, L., Fang, L., Yang, F., Mo, Y., Lao, J., et al. (2015). Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014–2015. *Emerging Infectious Diseases*, 21(7), 1240–1242.
- Matsushima, Y., Ishikawa, M., Shimizu, T., Komane, A., Kasuo, S., Shinohara, M., et al. (2015). Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveillance: Bulletin Européen sur les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 20(26), 21173.
- Medici, M. C., Tummolo, F., Calderaro, A., Chironna, M., Giammanco, G. M., De Grazia, S., et al. (2015). Identification of the novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy, 2015. *Euro Surveillance*, 20(35), 30010.
- Morillo, S. G., Luchs, A., Cilli, A., & do Carmo, S. T. T. M. (2012). Rapid detection of norovirus in naturally contaminated food: foodborne gastroenteritis outbreak on a cruise ship in Brazil, 2010. *Food Environmental Virology*, 4(3), 124–129.
- Morillo, S. G., Luchs, A., Cilli, A., Ribeiro, C. D., de Cássia, C. C. R., & do Carmo, S. T. T. M. (2017). Norovirus GII.Pe genotype: tracking a foodborne outbreak on a cruise ship through molecular epidemiology, Brazil, 2014. *Food and Environmental Virology*, 9(2), 142–148.
- Parra, G. I., & Green, K. Y. (2015). Genome of emerging norovirus GII.17, United States, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21, 1477–1479.
- Patel, M. M., Widdowson, M. A., Glass, R. I., Akazawa, K., Vinje, J., & Parashar, U. D. (2008). Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1224–1231.
- Pu, J., Kazama, S., Miura, T., Azraini, N. D., Konta, Y., Ito, H., et al. (2016). Pyrosequencing analysis of norovirus genogroup II distribution in sewage and oysters: First detection of GII.17 Kawasaki 2014 in Oysters. *Food and Environmental Virology*, 8(4), 310–312.
- Qin, M., Dong, X. G., Jing, Y. Y., Wei, X. X., Wang, Z. E., Feng, H. R., et al. (2016). A waterborne gastroenteritis outbreak caused by norovirus GII.17 in a Hotel, Hebei, China, December 2014. *Food and Environmental Virology*, 8(3), 180–186.
- Rasmussen, L. D., Schultz, A. C., Uhrbrand, K., Jensen, T., & Fischer, T. K. (2016). Molecular evidence of oysters as vehicle of norovirus GII.P17-GII.17. *Emerging Infectious Diseases*, 22(11), 2024–2025.
- Sanchez, M. A., Corcostégui, S. P., De Broucker, C. A., Cabre, O., Watier-Grillot, S., Perelle, S., et al. (2017). Norovirus GII.17 outbreak linked to an infected post-symptomatic food worker in a french military unit located in France. *Food and Environmental Virology*, 9(2), 234–237.
- Silva, L. D., Bandeira, R. D., Junior, E. C., Lima, I. C., da Penha Júnior, E. T., Teixeira, D. M., et al. (2017). Detection and genetic characterization of the emergent GII.17_2014 norovirus genotype among children with gastroenteritis from Northern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 48, 1–3.
- Vinje, J. (2015). Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 373–381.
- Zeng, S. Q., Halkosalo, A., Salminen, M., Szakal, E. D., Puustinen, L., & Vesikari, T. (2008). One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *Journal of Virology Methods*, 153(2), 238–240.

4.4-Molecular analysis of complete nucleotide sequences of norovirus GIIP.17-GII.17 detected in Brazil.

Objetivo:

-4. Realizar a caracterização molecular baseada no genoma completo das cepas brasileiras da nova variante, com a análise de alterações aminoacídicas presentes nos epítomos antigênicos localizados no subdomínio P2 da proteína VP1 e comparar diferenças genéticas e antigênicas (ORFs1, 2 e 3) das cepas brasileiras.

1 Type of paper: Article

2 **Molecular analysis of complete nucleotide sequences of norovirus**
3 **GII.P17-GII.17 detected in Brazil.**

4
5 Juliana da Silva Ribeiro de Andrade ^{1*}, Jesus Rodríguez-Díaz ², Javier Buesa ², Cristina
6 Santiso-Bellón ², José Paulo Gagliardi Leite ¹, Tulio Machado Fumian ¹, Marize Pereira
7 Miagostovich ¹.

8
9 1- Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Rio
10 de Janeiro, RJ, Brazil.

11 2- Department of Microbiology, Medical Faculty, University of Valencia, Valencia,
12 Spain.

13 *Correspondence: E-mail: juliana@ioc.fiocruz.br, Mailing address: Avenida Brasil,
14 4365, Manguinhos - CEP: 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Phone: 55-21-2562-
15 1899.

16 **Abstract:** Norovirus are the major cause of acute gastroenteritis worldwide being
17 genotype GII.4 responsible for most of outbreaks over the last decades. However, this
18 dominance has been replaced by a new GII.17 variant (GII.P17-GII.17) emerged in 2014-
19 2015 in some Asian countries. This study describe the phylogenetic analysis based on the
20 complete nucleotide sequence and amino acidic analysis of twelve Brazilian GII.P17-
21 GII.17 strains obtained from the different states within two years interval after its
22 introduction in American continent. Brazilian strains were grouped within subcluster C-
23 II, represented by the most recent variant of GII.17 that comprises epidemic strains that
24 circulated in Asia. Amino acid analyses reveled 2,2 % of differences in VP1 region when
25 compared with Asian strains and particular substitutions in major epitopes in P2
26 subdomain were observed in Brazilian strains.

27 **Keywords:** Human norovirus; GII.P17-GII.17; complete sequences; phylogenetic
28 analysis, Brazil.

29 1. Introduction

30 Human noroviruses are members of *Caliciviridae* family, *Norovirus* genus, and
31 are the leading cause of acute gastroenteritis (AGE) outbreaks, responsible for over than
32 200,000 deaths annually worldwide [1]. Norovirus infections are associated to sporadic
33 cases and outbreak across all age groups, with global prevalence estimated in 18% of all
34 AGE cases [1,2].

35 Norovirus genome is composed of a single-strand positive sense RNA with
36 approximately 7.5 kb in size and is organized into three open reading frames (ORFs1-3).
37 ORF1 encodes for six nonstructural proteins, including RNA-dependent RNA
38 Polymerase (RdRp). ORF2 and ORF3 encode for the major (VP1) and minor (VP2)
39 structural capsid proteins, respectively [3]. The VP1 capsid protein is composed 90
40 dimers, which form two domains: S (shell) and P (protruding). The S (50-225) domain
41 forms the inner part of the capsid that surrounds the RNA genome and the P domain is
42 subdivided into two subdomains: P1 (residues 226-278 and 406-520) and P2 (residues
43 279 - 405). The P2 subdomain covers a hypervariable region that comprises the major
44 epitopes associated with antigenicity and immune reactivity, participating in cellular
45 receptor binding and ABO histo-blood group antigen interaction [3].

46 Noroviruses are classified based on VP1 amino acid sequence into six genogroups
47 (GI and GIV) and a seventh group had been proposed [4,5]. Together, all genogroups are
48 subdivided into more than 30 genotypes, being the most diverse and frequent those
49 belonging to GII [4,5,6]. During decades GII.4 have been the prevalent genotype, mainly
50 due their epochal evolution, which new antigenic variants emerge each 3-5 years,
51 increasing norovirus global activity [7,8]. Recently, GII.17 has been highlighted by the
52 emergence of the variant GII.P17-GII.17 Kawasaki on Asia during the 2014-2015 winter,
53 that replaced the previously GII.4 variant in Asia and quickly dispersed throughout the
54 world [9,10,11,12,13,14,15, 16,17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25].

55 This study aims to describe aspects of molecular variation of GII.P17-GII.17
56 variant detected in Brazil by complete genome sequencing of twelve strains obtained
57 from different states within a period of two years after its first detection in 2015 [26].

58

59 **2. Material and Methods**

60 ***2.1. Samples and Ethics***

61 In Brazil, the epidemiological surveillance of AGE is carried out by a network of
62 Laboratories that meet demand from the National Health System of the Ministry of
63 Health. Laboratories belonging to this network receive clinical samples from hospitals
64 and health centers, by medical request, for clarification of etiological agent. In this
65 context, the Laboratory of Comparative and Environmental Virology performs the
66 diagnosis of cases of AGE receiving fecal samples from different states of the federation,
67 being this activity approved by the Institutional Ethics Committee under the number (No.
68 311/06). Between October 2015 and July 2016, the laboratory analyzed 750 cases, which
69 184 were diagnoses as noroviruses. Molecular characterization by partial nucleotide
70 sequencing using a set of primers previously described [27, 28], revealed the
71 characterization of 12 strains as GII.P17-GII.17. Those strains from three distinct
72 Brazilian States (Minas Gerais, Santa Catarina and Rio Grande do Sul) were processed
73 for complete nucleotide sequence analysis.

74 Viral RNA was extracted from 140 µl of 20% fecal suspension, using QIAamp
75 Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) in automatized system QiaCube
76 (QIAGEN) following the manufacturer's instruction. Samples were subjected to PCR
77 using six primer pairs, which generates six overlapping fragments covering the viral
78 genome and another two primers to sequence 5'- and 3'-ends, as previously described
79 [29]. Purified amplicons were submitted to the Sequencing Platform of Genomic and

80 Translational Genetics service of Principe Felipe Investigation Center, Valencia
81 University, Spain for Sanger sequencing. Complete GII.17 sequences were deposited into
82 GenBank database are under accession numbers: MH608288; MH638230; MH746922-
83 25; MH747479-82; MH890538-39.

84

85 ***2.2. Nucleotide and aa phylogenetic analysis***

86 Multiple sequence alignment was performed using BioEdit V7.2.6.1. Sequences
87 from different countries obtained from 1978 to 2016, were downloaded from GenBank
88 database and named with accession number, location and collection date (year).
89 Similarity searches were carried out using the BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) utility of the National Center for Biotechnology Information
90 (NCBI) database and, only sequences with complete or nearly complete ORFs1-3 were
91 included for analysis.

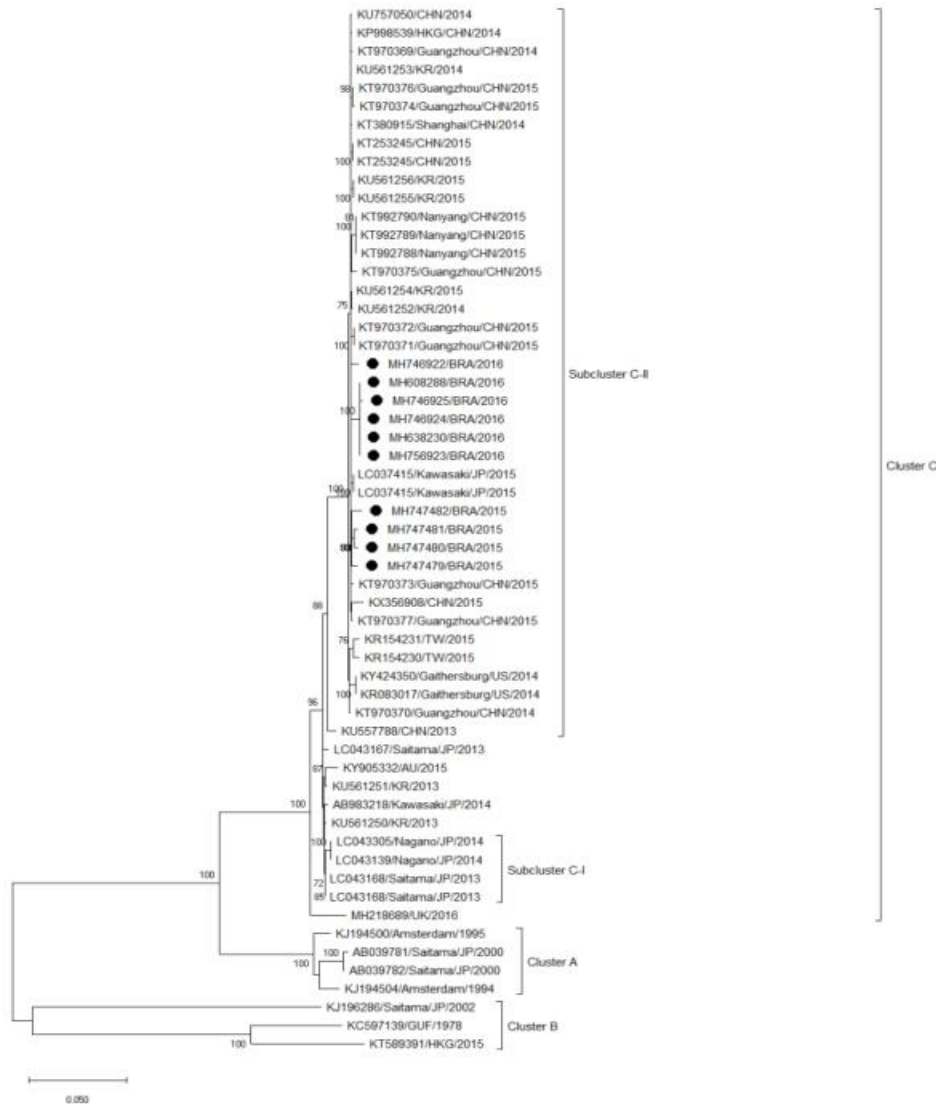
92
93 Phylogenetic analysis was performed using neighbor-joining reconstruction
94 method for the three ORFs sequences. Matrix of genetic distances was established using
95 Kimura-two parameter model [30] employing Molecular Genetic Analysis software
96 (MEGA version X) [31]. The amino acid (aa) variations within and between clusters were
97 analyzed by applying number of differences per sequence from averaging over all
98 sequence pairs between groups using Mega X.

99

100 **3. Results**

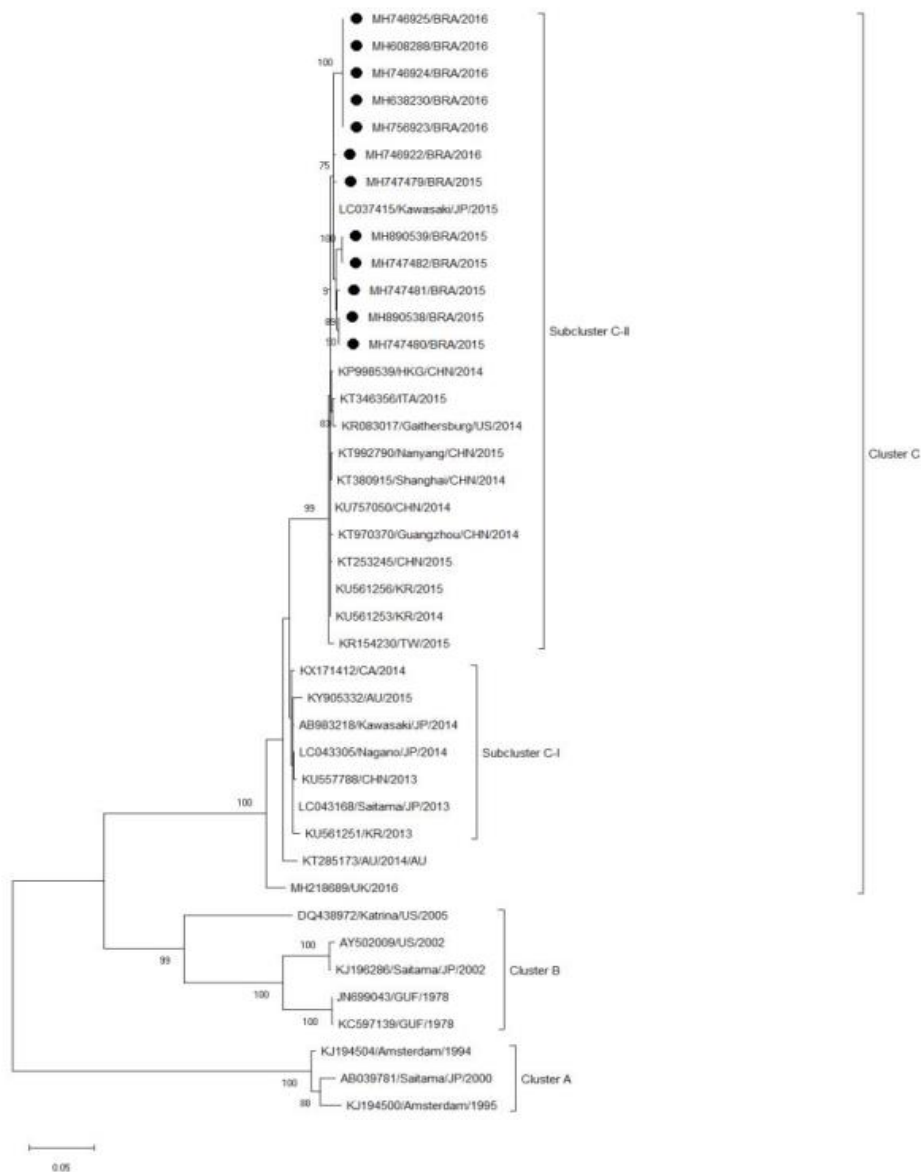
101 The twelve strains were successfully sequenced generating 7,480 bp each, with
102 percentage of nucleotide identity ranged from 98.2% to 100% in ORFs 1, 2 and 3.
103 Phylogenetic analysis of ORF-1,2 and 3 separately present the same topology revealing

104 all Brazilian strains grouped on subcluster C-II that comprise the most recent emergent
 105 strains of norovirus GII.P17/GII.17 detected in Asia (Figure 1, 2, and 3).



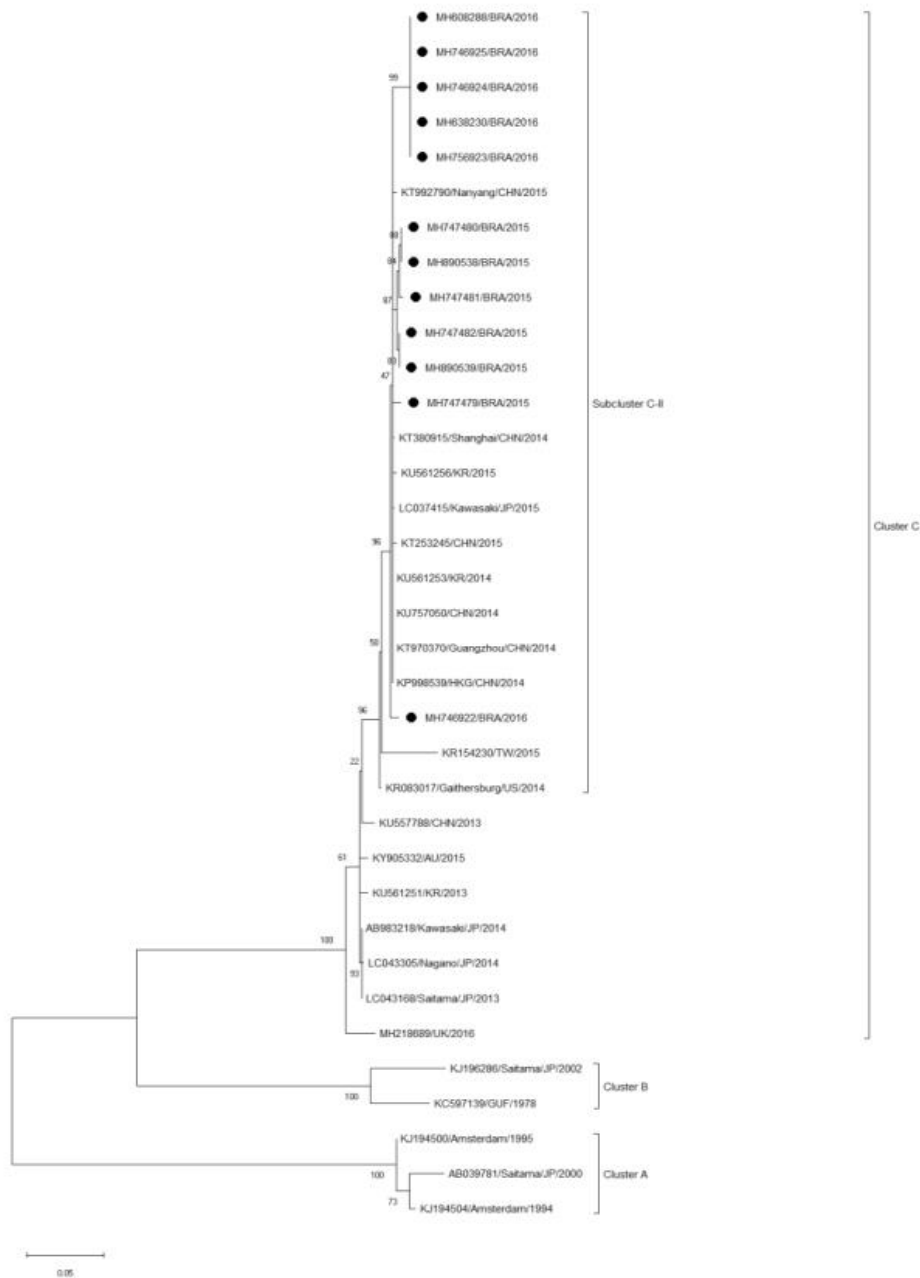
106

107 **Figure 1:** Phylogenetic tree based on the full-length nucleotide sequence of non-
 108 structural polyprotein (ORF-1) of the NoV GII.17 genotype, constructed using the
 109 maximum-likelihood method, and bootstrapped with 1,000 repetitions. Bootstrap values
 110 > 70% are indicated in the tree nodes. Brazilian strains are indicated with black dots.



111

112 **Figure 2:** Phylogenetic tree based on the full-length nucleotide sequence of capsid protein
 113 VP1 (ORF-2) of the NoV GII.17 genotype, constructed using the maximum-likelihood
 114 method, and bootstrapped with 1,000 repetitions. Bootstrap values > 70% are indicated
 115 in the tree nodes. Brazilian strains are indicated with black dots.
 116



117

118 **Figure 3:** Phylogenetic tree based on the full-length nucleotide sequence of capsid protein
 119 VP2 (ORF-3) of the NoV GII.17 genotype, constructed using the maximum-likelihood
 120 method, and bootstrapped with 1,000 repetitions. Bootstrap values > 70% are indicated
 121 in the tree nodes. Brazilian strains are indicated with black dots.

122 The analysis of aa variation shows that, among Brazilian isolates the number of
123 aa changes were 5 (1.9%). Comparing Brazilian strains with Cluster C strains and old
124 strains, the number of aa changes were 6 (2.3%) and 61 (23.1%), respectively.

125 Regarding ORF-1, our analysis demonstrated 11 (0.6%) aa changes among
126 Brazilian isolates. When compared with others strains of cluster C (subclusters C-I and
127 CII) and old strains (clusters A and B), the number of aa changes were 18 (1%) and 131
128 (7.7%), respectively. We detected four singular aa substitutions specifically among a
129 group of Brazilian strains at the N-terminal protein (D216E, T298I), NTPase (A403S)
130 and at the protease 3C-like (I1154M) (Table 1). Also among Brazilian isolates, we
131 identified four consecutives aa substitutions at the position 1346-1349. Comparing
132 residues previously associated to fitness viral of ORF1, one substitution at the N-terminal
133 protein was identified (A187D), however, none substitution was observed at residue 739
134 (S) in protease, differing only between USA strain (S739N).

135 **Table 1:** Amino acid substitutions in the major epitopes of VP1 sequence of norovirus GII.17 over the time. Dashes indicate deletions/insertions of the amino
 136 acid residues. Amino acid numbering is based on the sequence of the Kawasaki 323 strain (LC037415).

Strains	Consensus amino acid position (major epitopes)				
	Epitope I 217-225	Epitope II 291-298	Epitope III 359-363	Epitope IV 371-379	Epitope V 390-396
MH746922/BRA/2016	P P S V E S K T K	T A Q I - - - - - N Q R D	S P Q F V	L R I S D N D D F Q	V N D D D D G H
MH756923/BRA/2016
MH638230/BRA/2016
MH746924/BRA/2016
MH746925/BRA/2016
MH608288/BRA/2016	I
MH890539/BRA/2015 N
MH890538/BRA/2015
MH747479/BRA/2015
MH747480/BRA/2015
MH747481/BRA/2015
MH747482/BRA/2015 N
KT253245/CHN/2015
LC037415/Kawasaki/JP/2015
KT346356/ITA/2015
KP998539/HKG/CHN/2014
KR083017/Gaithersburg/US/2014
MH218689/UK/2016	.	E P - - - - - S R S	.	F K . . S D	I . E E . . D .
KY905332/AU/2015	.	E T - - - - - D H .	.	F . S N	I . . . G . . .
KX171412/CA/2014	.	E T - - - - - D H H .	.	F . S N . D	I . . . G . . .
AB983218/Kawasaki/JP/2014	.	E T - - - - - D H .	.	F . S N	I . . . G . . .
LC043168/Saitama/JP/2013	.	E T - - - - - D H .	.	F . S N	I . . . G . . .
KU557788/CHN/2013	.	E T - - - - - D H .	.	F . S N	I . . . G . . .
DQ438972/Katrina/US/2005	.	S . D V Q - - - - - N S H Q .	T	F G S E S E . F Q V	I K I E T G . .
AY502009/US/2002	.	D V D - - - - - G S H D .	S	F G S T S T . F Q L	I K I E S G . .
KJ196286/Saitama/JP/2002	.	D V D - - - - - G S H D .	S	F G S T S T . F Q L	I K I E S G . .
KC597139/GUF/1978	.	D V H - - - - - Q S H D .	S	F G S T S D . F Q L	I K V E S G . .
AB039781/Saitama/JP/2000	. . T	R S T S R A S D Q T D T P T P R L F N H	. G R . T	I T T E S D . L D T	I G V . N E - A
KJ194504/Amsterdam/1994	. . T	R S T S R A S D Q A D T P T P R Q F D H	T N R . T	I I T E S E . F D T	. G V . N E - E
KJ194500/Amsterdam/1995	. . T	G S T S R A S D Q T D T P T P R Q F D R	. D R . A	I T T E S G . F E A	I G V . N E - A

138 The analysis of aa sequence of VP1 protein, comparing Brazilian strains to other
139 GII.17 representative strains isolated from 1978 to 2016, demonstrated major aa
140 substitutions occurred from 2013 strains (Cluster C), which is the period that the first novel
141 GII.17 variant was detected. The number of aa difference between Brazilian strains and
142 belonging to the cluster C were 12 (2.2%) and compared to strains from clusters A and B the
143 difference were 100 residues (18.1%) (Table2). These substitutions were mainly
144 accumulated in the protruding P2 domain with 10 (6.9%) substitution compared with Cluster
145 C and 45 (31.55%) comparing old strains. In contrast, Shell domain accumulates 1 (0.6%)
146 and 16 (9.1%); protruding P1 domain 1 (0.6%) and 27 (15%) aa substitutions between
147 Brazilian strains and Cluster C and old strains, respectively. When we compared Brazilian
148 strains with C-II strains for the complete VP1 sequence, we observed 12 (2.2%) aa
149 substitution. However, almost all aa substitutions were concentrated at the P2 domain, where
150 the number of changes were 10 (7%). Comparing Brazilian strains with old strains (Cluster
151 A and B), the number of substitutions were 100 (18.1%) in the entire VP1 sequence, while
152 at the P2 domain were 45 (31.5%).

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163 **Table 2:** Number of amino acid (aa) changes per sequence from averaging over all sequence pairs
 164 between clusters of norovirus GII.17 according to complete VP1 sequence and subdomains S, P1
 165 and P2.

166

167

168

169

170

171

172

173

Strain	Nº of aa substitution (%)				
	Compared strains	Complete VP1	Subdomain P2	Subdomain Shell	Subdomain P1
Brazilian	Cluster A-B	100 (18.1)	45 (31.5)	16 (9.1)	27 (15.9)
	Cluster C	12 (2.2)	10 (6.9)	1 (0.6)	1 (0.6)
	Cluster CII	2 (0.4)	2 (1.4)	1 (0.6)	0
	Cluster CI	25 (4.5)	21 (14.7)	1 (0.6)	3 (1.8)
Other Cluster C strains	Cluster A-B	97 (17,5)	48(33.6)	16 (9.1)	27 (15.9)

174 The analysis involved 41 amino acid sequences. The Brazilian strains comprise the twelve strains
 175 described in this study. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There was a
 176 total of 54 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 7 [31].

177

178 We also compared aa substitutions at the positions 217-225 (epitope I), 291-298
 179 (epitope II), 359-363 (epitope III), 371-379 (epitope IV) and 390-396 (epitope V) (Table 1).
 180 Epitope I conserved all residues between the GII.17 strains, except for a single aa change in
 181 the residue at position 219 within strains belonging to Cluster A. Despite the low aa
 182 divergence on epitope I, comparison among aa sequences on the other four epitopes (II – V)
 183 demonstrate expressive variability with deletions, insertions and substitutions between old
 184 and novel GII.17 strains and also between the novel variant. Brazilian strains present two
 185 aa deletions at the epitope II, between position 294-295, when compared to viruses from
 186 cluster B, and 13 aa deletions compared to viruses from cluster A, similar to other Cluster C
 187 strains. Two aa substitutions were identified on Brazilian strains in epitope V (N390I and
 188 H396N) compared with other C-II strains. In addition, we also identified in Brazilian strains
 189 an aa insertion (Gly) in epitope V, similar to observed in all strains from Cluster C-II.

190 We notice that the aa substitution between Brazilian strains from 2016 and the UK
 191 2016 strain is higher (6.9%) when compared with 2013- 2014 strains from subcluster C-I
 192 (4.5%). The UK 2016 isolate presented aa substitutions identical to C-I strains on epitopes
 193 I, IV and V. However, particular substitutions at the positions 294-297 (epitope II); 372,375
 194 (epitope IV); 392-393 (epitope V) and one insertion at the epitope V (table 1) becoming clear
 195 why this strain was external to cluster C.

196 The alignment of minor structural capsid protein VP2 aa sequences (ORF-3) revealed
 197 that the major aa substitutions occurred from 2013 strains. Four aa changes were identified
 198 only among Brazilian isolates (I33V; G73E; S123A; S129N) (Table 3). Variations in
 199 residues associated with viral fitness in ORF2 were observed in all Brazilian strains (K58R
 200 and A89S) as well identified in strains grouped on subcluster C-II.

201

202 **Table 3:** Main amino acid substitutions in nonstructural polyprotein (ORF1) and VP2 (ORF3) of
 203 Brazilian isolates from 2015 and 2016.

Position	Reference ^a	BRA 2015 (n)	BRA 2016 (n)
Nonstructural Polyprotein (ORF-1)			
186*	A	D (6)	D (6)
216	D	E (2)/ D(4)	E (5)/ D (1)
298	I	I (6)	T (5)/ I (1)
403	A	A (6)	S (5)/ A (1)
738*	S	S (6)	S (6)
1154	I	M (6)	I (6)
1161	F	L (6)	F (6)
VP2 (ORF-3)			
33	I	V (5)/S (1)	I (6)
58*	K	R (6)	R (6)
73	G	E (5)/G (1)	G (6)
89*	A	S (6)	S(6)
123	A	A (6)	S (5)/A (1)
129	S	S (6)	N (6)/S (1)

204 Amino acid numbering is based on the sequence of the Kawasaki 323 strain (LC037415).

205 a- Sequence reference: Kawasaki 323 strain (LC037415).

206 *Residue speculated to affect viral fitness of norovirus GIIP.17/GII.17 in humans.

207

208 4. Discussion

209 The complete sequencing of Brazilian norovirus strains characterized as of Nov
210 GII.P17/GII.17 Kawasaki_2014 enabled the phylogenetic analysis based on complete ORF-
211 1, ORF-2 and ORF-3, that revealed a tree topology divided in three different clusters (A, B
212 and C). As supported previously by earlier studies [32,33], strains collected between 1978
213 and 2002 were comprised on cluster I, cluster II contains strains from 1994 to 2000 while
214 cluster III include strains from 2013 to 2016. Cluster C were subdivided into two subclusters
215 which demonstrate the diversification of the emergent GII.P17-GII.17 Kawasaki variant
216 viruses into two phylogenetic sublineages. Some studies recognized these sublineages as two
217 different variants: variant C with strains detected in 2013-2014 and variant D with strains
218 detected 2014 and onwards-2015 [32,34].

219 Brazilian GII.17 strains, detected in 2015 and 2016, are closely related with to the
220 most recent Asian strains from 2014-2016 (subcluster C-II), as well as also grouping with
221 other strains detected in countries outside Asia, such as Italia and USA [14,19]. Asian strains
222 detected in 2015-2016 were considered the epidemic variant of the GII.17 Kawasaki_2014,
223 which suggest that virus detected in Brazil in 2015 and 2016 were derived from the most
224 evolved strains that caused epidemics in Asia.

225 Although all Brazilian and Asian strains detected in 2015-2016 were grouped on
226 subcluster C-II, an Australian from 2015 strain grouped within subcluster C-I comprising
227 2013-2014 strains, which may suggest that evolved independently from ancestral of
228 subcluster C-II. We also draw attention to a strain from UK from 2016 that grouped
229 externally to the main group (Cluster C), comparable to observed Argentinean strain detected
230 in 2015 described in previous study that suggested this virus can represent a new variant on
231 GII.17 genotype [22].

232 Analysis of VP1 protein sequences demonstrated that the major amino acid
233 substitutions on GII.17 strains started on strains isolated from 2013, the period when the
234 novel variant of norovirus GII.17 emerged. Cluster C grouped all Brazilian isolates with
235 norovirus GII.P17-GII.17 and our comparisons with old strains revealed that P2 subdomain
236 concentrates the major aa changes between GII.17 strains. The P2 subdomain is the most
237 exposed and diverse region of VP1 protein, comprising the main epitopes associated with
238 humoral immunity and receptor binding domain [13,35]. Our findings showed that subclusters
239 C-I and C-II showed several changes in these epitopes, mostly on epitopes II-V. Although
240 grouped on cluster C-II, Brazilian strains present two aa substitutions at the epitope V (N390I
241 and H396N) when compared with C-II strains. Numerous studies demonstrated that amino
242 acid variations on VP1 protein over the time, mainly on the P2 subdomain, can confer new
243 antigenic properties creating a mechanism to evade human immune system [11, 13, 32, 36,
244 37].

245 Analysis of aa sequences of polyprotein evidenced aa substitutions on Brazilian
246 strains located in N-terminal protein (A187D, D216E, T298I), NTPase (A403S) and at the
247 protease 3C-like (I1154M), proteins involved with viral replication. As well, changes at VP2
248 residues (I33V; K58R; G73E; A89S; S123A; S129N) were observed. Changes in residues
249 of nonstructural polyprotein and VP2 might affecting viral fitness whereas that proteins were
250 related with efficiency of norovirus replication [3, 11].

251 These results make evident the plasticity and the rapid evolution ability of the
252 norovirus GII.17, find out that the emergence of GII.17 Kawasaki is notably different from
253 the pattern of emergence of GII.4 variants. While GII.4 variants are replaced by new variant
254 every 3-8 years, GII.17 Kawasaki_2014 variant had a rapidly replacement between variant
255 C for D within two seasons during the global spread, endorsing the fast-evolving
256 characteristic of these viruses [13,32].

257 5. Conclusions

258 The strains that circulated between 2015-2016 in Brazil were branch from the
259 epidemic variant strains that caused outbreaks in Asia in the same period. Brazilian strains
260 presented particular amino acid alterations not observed in other strains, which may have
261 been acquired during its circulation in the country. The rapid genetic diversification of
262 variants of norovirus GII.P17-GII.17 with emergence of different sublineages makes evident
263 the change on viral fitness.

264

265 Author Contributions

266 Conceived and designed the experiments: JSRA JRD TMF CSB JB JPGL MPM. Performed
267 the experiments: JSRA JRD TMF CSB. Analyzed the data: JSRA JRD TMF CSB MPM.
268 Contributed reagents/materials/analysis tools: JSRA JRD TMF JB CSB JPGL MPM. Wrote
269 the paper: JSRA TMF JRD JB CSB JPGL MPM.

270

271 Funding

272 This work was supported by Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Brazilian National Council for
273 Scientific and Technological Development (CNPq), Carlos Chagas Filho Foundation for
274 Research Support in the State of Rio de Janeiro (Faperj) and by Spanish Government
275 (Ministerio de Economia y Competitividad) grants AGL2014-52996-C2-2-R and RYC-
276 2013-12442 to J.R.D. This study was financed in part by the Coordenação de
277 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

278

279 Acknowledgments

280 The authors thank Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, the Department of Microbiology of
281 Medical Faculty, University of Valencia, the Coordination of Personal Improvement of
282 Higher Education (CAPES), Brazilian National Council for Scientific and Technological

283 Development (CNPq) and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State
284 of Rio de Janeiro (Faperj). MPM and JPG Leite are research productivity fellowships of
285 CNPq/Faperj.

286

287 **Conflicts of Interest**

288 The authors declare no conflict of interest.

289

290 **References**

291

292 1. Ahmed, S.M.; Hall, A.J.; Robinson, A.E.; Verhoef, L.; Premkumar, P.; Parashar, U.D.;
293 Koopmans, M.; Lopman B.A. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A
294 systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **2014**, *14*, 725-730, DOI:
295 10.1016/S1473-3099(14)70767-4.

296 2. Patel, M.M.; Widdowson, M.A.; Glass, R.I.; Akazawa, K.; Vinje, J.; Parashar, U.D.
297 Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg*
298 *Infect Dis* **2008**, *14*, 1224-31, DOI: 10.3201/eid1408.071114.

299 3. Hardy, M.E. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* **2005**, *253*,
300 1-8.

301 4. Zheng, D.P.; Ando, T.; Fankhauser, R.L.; Beard, R.S; Glass, R.I; Monroe, S.S. Norovirus
302 classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, **2006**, *346*: 312-23.

303 5. Vinje, J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin*
304 *Microbiol* **2015**, *53*, 373-81, DOI: 10.1128/JCM.01535-14.

305 6. Kroneman, A.; Vega, E.; Vennema, H.; Vinje, J.; White, P.A.; Hansman, G.; Green, K.;
306 Martella, V.; Katayama, K.; Koopmans M.. Proposal for a unified norovirus nomenclature
307 and genotyping. *Arch Virol* **2013**, *158*, 2059-68, DOI: 10.1007/s00705-013-1708-5.

308 7. Bull, R.A.; Eden, J.S.; Rawlinson, W.D.; White, P.A. Rapid evolution of pandemic
309 noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog* **2010**, *6*, e1000831, DOI:
310 10.1371/journal.ppat.1000831.

311 8. Lindesmith, L.C.; Costantini, V.; Swanstrom, J.; Debbink, K.; Donaldson, E.F.; Vinjé, J.;
312 Baric, R.S. Emergence of a norovirus GII.4 strain correlates with changes in evolving
313 blockade epitopes. *J Virol* **2013**, *87*, 2803-13, DOI: 10.1128/JVI.03106-12.

314 9. Gao, Z.; Li, X.; Yan, H.; Li, W.; Jia, L.; Hu, L.; Hu, H.; Liu, B.; Li, J.; Wang, Q. Human
315 calicivirus occurrence among outpatients with diarrhea in Beijing, China, between April
316 2011 and March 2013. *J Med Virol* **2015**, *87*, 2040-7, DOI: 10.1002/jmv.24265.

317 10. Jung, S.; Hwang, B.M.; Jung, H.; Chung, G.; Yoo, C.K.; Lee, D.Y. Emergence of
318 Norovirus GII.17-associated Outbreak and Sporadic Cases in Korea from 2014 to 2015.
319 *Osong Public Health Res Perspect* **2017**, *8*, 86-90, DOI: 10.24171/j.phrp.2017.8.1.12.

320 11. Chan, M.C.W.; Lee, N.; Hung, T-N.; Kwok, K.; Cheung, K.; Tin, E.K.Y.; Lai, R.W.;
321 Nelson, E.A.; Leung, T.F.; Chan, P.K. Rapid emergence and predominance of a broadly

- 322 recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nat Commun* **2015**, 2,
323 10061, DOI: 10.1038/ncomms10061.
- 324 12. Dang Thanh, H.; Than, V.T.; Nguyen, T.H.; Lim, I.; Kim, W. Emergence of Norovirus
325 GII.17 Variants among Children with Acute Gastroenteritis in South Korea. *PLoS One* **2016**,
326 11, e0154284, DOI: 10.1371/journal.pone.0154284.
- 327 13. Matsushima, Y.; Ishiakwa, M.; Shimizu, T.; Komane, A.; Kasuo, S.; Shinohara, M.;
328 Nagasawa, K.; Kimura, H.; Ryo, A.; Okabe, N.; Haga, K.; Doan, Y.H.; Katayama, K.;
329 Shimizu, H. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from
330 December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid
331 substitutions in the capsid region. *Euro Surveill* **2015**, 20, 21173.
- 332 14. Medici, M.C.; Tummolo, F.; Calderaro, A.; Chironna, M.; Giammanco, G.M.; De
333 Grazia, S.; Arcangeletti, M.C.; De Conto, F.; Chezzi, C.; Martella, V. Identification of the
334 novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy, 2015. *Euro Surveill*
335 **2015**, 20, 30010, DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.35.30010.
- 336 15. Sanchez, M.A.; Corcostégui, S.P.; De Broucker, C.A.; Cabre, O.; Watier-Grillot, S.;
337 Perelle, S.; Ambert-Balay, K.; Pommier de Santi, V. Norovirus GII.17 Outbreak Linked to
338 an Infected Post-Symptomatic Food Worker in a French Military Unit Located in France.
339 *Food Environ Virol* **2017**, 9, 234-237, DOI: 10.1007/s12560-016-9274-0.
- 340 16. Lopes-João, A.; Mesquita, J.R.; de Sousa, R.; Oleastro, M.; Silva, C.; Penha-Gonçalves,
341 C.; Nascimento, M.S.J. Country-wide surveillance of norovirus outbreaks in the Portuguese
342 Army, 2015-2017. *J R Army Med Corps* **2018**, 164, 419-422, DOI: 10.1136/jramc-2018-
343 000991.
- 344 17. Dinus, S.; Nagy, M.; Negru, D.G.; Popovici, E.D.; Zota, L.; Oprisan, G. Molecular
345 identification of emergent GII. P17-GII.17 norovirus genotype, Romania, 2015. *Euro*
346 *Surveill* **2016**, 21, 30141, DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.7.30141.
- 347 18. LeBlanc, J.J.; Pettipas, J.; Gaston, D.; Taylor, R.; Hatchette, T.F.; Booth, T.F.; Mandes,
348 R.; McDermid, A.; Grudeski, E. Outbreak of Norovirus GII.P17-GII.17 in the Canadian
349 Province of Nova Scotia. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **2016**, 2016, 1280247,
350 DOI:10.1155/2016/1280247.
- 351 19. Parra, G.I.; Green, K.Y. Genome of emerging norovirus GII.17, United States, 2014.
352 *Emerg Infect Dis* **2015**, 21, 1477-9, DOI: 10.3201/eid2108.150652.
- 353 20. Bruggink, L.D.; Moselen, J.M.; Marshall, J.A. The molecular epidemiology of norovirus
354 outbreaks in Victoria, 2014 to 2015. *Commun Dis Intell Q Rep* **2017**, 31, E21-E32.

- 355 21. de Graaf, M.; van Beek, J.; Vennema, H.; Podkolzin, A.T.; Hewitt, J.; Bucardo, F.;
356 Templeton, K.; Mans, J.; Nordgren, J.; Reuter, G.; Lynch, M.; Rasmussen, L.D.; Iritani, N.;
357 Chan, M.C.; Martella, V.; Ambert-Balay, K.; Vinjé, J.; White, P.A.; Koopmans, M.P.
358 Emergence of a novel GII.17 norovirus – end of the GII.4 era? *Euro Surveill* **2015**, *20*,
359 22. Degiuseppe, J.I.; Gomes, K.A.; Hadad, M.F.; Parr, a G.I.; Stupka, J.A. Detection of novel
360 GII.17 norovirus in Argentina, 2015. *Infect Genet Evol* **2017**, *47*, 121-124,
361 DOI:10.1016/j.meegid.2016.11.026.
- 362 23. Silva, L.D.; Bandeira, R.D.; Junior, E.C.; Lima, I.C., da Penha Júnior, E.T.; Teixeira,
363 D.M.; Siqueira, J.A.; Resque, H.R.; de Abreu Campos, E.M.; Justino, M.C.; Linhares, A.C.;
364 Gabbay, Y.B. Detection and genetic characterization of the emergent GII.17_2014 norovirus
365 genotype among children with gastroenteritis from Northern Brazil. *Infect Genet Evol* **2017**,
366 *48*, 1-3, DOI: 10.1016/j.meegid.2016.11.027.
- 367 24. Andrade, J.S.R.; Fumian, T.M.; Leite, J.P.G.; Assis, M.R.; Bello, G.; Mir, D.;
368 Miagostovich M.P. Detection and molecular characterization of emergent GII.P17/GII.17
369 Norovirus in Brazil, 2015. *Infect Genet Evol* **2017**, *51*, 28-32, DOI:
370 10.1016/j.meegid.2017.03.011.
- 371 25. Andrade, J.S.R.; Fumian, T.M.; Leite, J.P.G.; de Assis, M.R.; Fialho, A.M.; Mouta, S.;
372 Santiago, C.M.P; Miagostovich, M.P. Norovirus GII.17 Associated with a Foodborne Acute
373 Gastroenteritis Outbreak in Brazil, 2016. *Food Environ Virol* **2018**, *10*, 212-216, DOI:
374 10.1007/s12560-017-9326-0.
- 375 26. Lu, J.; Sun, L.; Fang, L.; Yang, F.; Mo, Y.; Lao, J.; Zheng, H; Tan, X.; Lin, H.;
376 Rutherford, S.; Guo, L.; Ke, C.; Hui, L. Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus
377 GII.17, Guangdong Province, China, 2014–2015. *Emerg Infect Dis* **2015**, *21*, 1240-2, DOI:
378 10.3201/eid2107.150226.
- 379 27. Kojima, S.; Kageyama, T.; Fukushi, S.; Hoshino, F.B.; Shinohara, M.; Uchida, K.;
380 Natori, K.; Takeda, N.; Katayama, K. Genogroup-specific PCR primers for detection of
381 Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* **2002**, *100*, 107-14.
- 382 28. Beuret, C.; Kohler, D.; Baumgartner, A.; Lüthi, T.M. Norwalk-like virus sequences in
383 mineral waters: one year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol* **2002**, *68*,
384 1925-31.
- 385 29. Xue, L.; Cai, W.; Wu, Q.; Zhang, J.; Guo, W.; Direct sequencing and analysis of the
386 genomes of newly emerging GII.17 norovirus strains in South China. *J Appl Microbiol* **2016**,
387 *120*, 1130-5, DOI: 10.1111/jam.13052.

- 388 30. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions
389 through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **1980**, 16, 111-20.
- 390 31. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
391 version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* **2016**, 33, 1870-4, DOI:
392 10.1093/molbev/msw054.
- 393 32. Parra, G.I.; Squires, R.B.; Karangwa, C.K.; Johnson, J.A.; Lepore, C.J.; Sosnovtsev,
394 S.V.; Green, K.Y. Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology
395 and Immunity. *PLoS Pathog* **2017**, 13, e1006136, DOI: 10.1371/journal.ppat.1006136.
- 396 33. Ji, L.; Chen, L.; Xu, D.; Wu, X.; Han, J. Nearly complete genome sequence of one GII.17
397 Norovirus identified by direct sequencing from HuZhou, China. *Mol Genet Genomic Med*
398 **2018**, 6, 796-804, DOI: 10.1002/mgg3.446.
- 399 34. Sang, S.; Yang, X. Evolutionary dynamics of GII.17 norovirus. *PeerJ* **2018**, 6, e4333,
400 DOI: 10.7717/peerj.4333.
- 401 35. Lindesmith, L.C.; Donaldson, E.F.; Lobue, A.D.; Cannon, J.L.; Zheng, D.P.; Vinje, J.;
402 Baric R.S. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med*
403 **2008**, 5, e31, DOI: 10.1371/journal.pmed.0050031.
- 404 36. Lindesmith, L.C.; Beltramello, M.; Donaldson, E.F.; Corti, D.; Swanstrom, J.; Debbink,
405 K.; Lanzavecchia, A.; Baric, R.S. Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4
406 antigenic variation. *PLoS Pathog* **2012**, 8, :e1002705, DOI: 10.1371/journal.ppat.1002705.
- 407 37. Lindesmith, L.C.; Kocher, J.F.; Donaldson, E.F.; Debbink, K.; Mallory, M.L.; Swann,
408 E.W.; Brewer-Jensen, P.D.; Baric, RS. Emergence of Novel Human Norovirus GII.17
409 Strains Correlates With Changes in Blockade Antibody Epitopes. *J Infect Dis* **2017**, 216,
410 1227-1234, DOI: 10.1093/infdis/jix385.

5- Discussão

Visando contribuir para os estudos de norovírus no país, esta tese teve como objetivo realizar vigilância epidemiológica de recombinantes e variantes destes vírus, buscando demonstrar o impacto da introdução e circulação de vírus emergentes em surtos e casos esporádicos de GA. O resultado desta investigação gerou quatro artigos científicos que contribuíram com dados originais referentes a caracterização de recombinantes de norovírus não-GII.4 associados a surtos ocorridos no sul do país (Item 5.1) e dados sobre a primeira detecção da variante GII.P17 - GII.17 Kawasaki_2014 no Brasil, com ênfase em estudos de filogenia, relógio molecular, associação à surto de origem alimentar e análise de sequências do genoma completo (itens 5.2 a 5.4).

5.1- Detecção e caracterização de norovírus recombinantes isolados de surtos de gastroenterite aguda na região sul do Brasil, no período de 2004 a 2011 (Artigo 1)

Em um estudo prévio (Andrade et al., 2004) realizado durante o período de 2004 a 2011 no estado do Rio Grande do Sul (RS), região de fronteira com três países, a detecção e caracterização molecular de uma grande diversidade de genótipos de norovírus não-GII.4 em casos de surto de GA ressaltou para a possibilidade de se tratarem de vírus recombinantes, tendo em vista os diversos estudos que demonstraram a caracterização de diferentes recombinantes intergenotípicos entre norovírus (Vinje et al., 1996; Vennema et al., 2002; White, 2014).

Neste contexto, o genoma destes vírus foi sequenciado parcialmente e demonstrou-se a alta prevalência de recombinantes de norovírus associados a surtos de GA no sul do país. A caracterização de recombinantes em mais de 80% das cepas de norovírus não-GII.4 detectados nesse estudo enfatiza a importância da caracterização combinada de ambas regiões, ORF-1 e ORF-2 nos estudos de vigilância, uma vez que, conforme mencionado anteriormente, a recombinação entre os norovírus ocorre principalmente próximo ou dentro da região de sobreposição entre as ORFs 1 e 2 (Bull et al., 2005; Eden et al., 2013).

Este estudo demonstrou a alta diversidade de norovírus recombinantes circulantes na região sul do Brasil no período de 2004 a 2011, com a caracterização de oito recombinantes diferentes, representando a maior porcentagem dos norovírus não-GII.4 (85%), tendo em vista que os dados sobre prevalência e diversidade de recombinantes no Brasil sejam subestimados, assim como em outras partes do mundo. Nossos dados corroboram um estudo conduzido em Singapura onde somente os genótipos GII. 6 e GII.7 não apresentaram recombinação dentre todos os genótipos não GII.4 caracterizados (Lim et al., 2013).

O recombinante GII.P7-GII.6 foi o prevalente entre os caracterizados, sendo também o detectado por maior período em circulação (2004-2010). Na América Latina o recombinante GII.P7-GII.6 foi descrito nos anos de 2011-2012 em amostras de diarreia e vômito de pacientes uruguaios (Fajardo et al., 2014). A análise nucleotídica entre as cepas brasileiras e uruguaias demonstraram alta similaridade (93-97%), indicando a circulação do mesmo vírus recombinante nos dois países, o que pode ser explicado pela localização geográfica de fronteira entre o estado do Rio Grande do Sul e o Uruguai. No Brasil, o genótipo GII.7 foi detectado em 2008 em crianças de uma comunidade afrodescendente assentada na região norte do país, caracterizados como recombinantes GII.7-GII.20 (Fumian et al., 2012). Recentemente, também na região norte, o norovírus recombinante GII.P7.GII.6 foi detectado co-circulando com outros recombinantes em pacientes pediátricos (Hernandez., 2016).

Em 2012, a emergência da variante epidêmica GII.4 Sydney_2012 como o vírus recombinante GII.Pe-GII.4 Sydney foi descrito como principal responsável pelo aumento da atividade dos norovírus, causando epidemias em diversos países, incluindo Austrália, Nova Zelândia, França, Portugal, Japão, China e Estados Unidos (Eden et al., 2013, van Beek et al., 2013, Chan et al., 2013, CDC et al., 2013, Lopes-João, et al., 2018). Um estudo recente demonstrou que este recombinante não só aumentou o número de casos de GA como também foi o prevalente, com cerca de 51,4% de todas as variantes de GII.4 no período de 2005-2016, em todo o mundo (van Beek et al., 2018).

A circulação de diversos norovírus recombinantes no Brasil demonstra a habilidade desses vírus em dispersar e causar surtos de GA. A grande diversidade e frequência dos norovírus recombinantes circulantes no país, reforça a importância da manutenção de uma vigilância epidemiológica constante dos norovírus. Do mesmo modo, redes de vigilância internacionais que sejam conectadas com o intuito de que informações como prevalência, diversidade e dispersão desses vírus sejam compartilhadas com maior rapidez e eficiência. Recombinações intra e intergenotípicas conferem um benefício maior no que diz respeito ao *fitness* viral e a dinâmica das infecções por norovírus, permitindo o escape viral do sistema imune da população susceptível, se dispersando com maior eficiência, resultando em uma incidência maior das infecções por norovírus em casos de GA, o que tem implicações diretas no desenvolvimento de uma vacina eficaz (Lindesmith et al., 2017; Cortez-Penfield et al., 2017).

5.2-Detecção e caracterização molecular de norovírus GII.P17-GII.17 Kawasaki_2014 emergente no Brasil, 2015

5.2.1- Estudo filogenético (ORF 2), análise de relógio molecular e filogeografia de isolados brasileiros (Artigo 2)

Com o objetivo de estudar a relação filogenética, realizar análises de relógio molecular, estimar introdução e origem, seis isolados do norovírus emergente GII.P17-GII.17 Kawasaki_2014 detectados no Brasil no ano de 2015, foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico do gene completo da VP1 (ORF-2). No período de maio a setembro de 2015, os norovírus GII foram detectados em uma prevalência de 28% de todas as amostras de GA recebidas no LVCA para diagnóstico. A alta prevalência dos norovírus demonstrada neste estudo corrobora estudos prévios conduzidos no Brasil, embora supere as estimativas de prevalência mundial das infecções por norovírus (Ferreira et al., 2010, 2012; Fioretti et al., 2012; Aragão et al., 2013; Ahmed et al., 2014)

Os isolados brasileiros agruparam no subcluster C-II, onde estão representadas as cepas mais recentes da variante Kawasaki_2014,

detectadas na China, Hong Kong em 2014 e 2015, além de cepas provenientes de países não asiáticos como Itália e Estados Unidos. A caracterização desses vírus em amostras do ano de 2015 evidencia a rapidez na dispersão dessa nova variante que, primeiramente foi detectada causando surtos de GA na Ásia no ano anterior e em 2015 (Chan et al., 2015; Matsushima et al., 2015; Lu et al., 2016).

Cepas brasileiras detectadas em 2005 e 2006, são geneticamente distintas e agruparam nos clusters A e B onde estavam representadas cepas antigas, isoladas no período compreendido entre 1978 e 2009. Algumas dessas cepas, caracterizadas também pela ORF-1, apresentaram recombinação com diferentes genótipos de RNA polimerase. Cepas paraguaias que circularam entre 2004-2005 também agruparam nos clusters A e B, país vizinho ao Brasil, o que indica que o mesmo vírus pode ter circulado em ambos os países.

As análises filogenéticas demonstraram que genótipo GII.17 se ramifica em três linhagens diferentes, compreendendo duas linhagens que agrupam isolados antigos de 1978 a 2009 e a linhagem que abrange a nova variante Kawasaki, corroborando dados de estudos anteriores. A linhagem Kawasaki_2014 por sua vez, se divide em duas linhagens diferentes, uma Kawasaki-pré-epidêmica e a Kawasaki_2014 epidêmica, compreendendo isolados de 2013-2014 e 2014-2015, respectivamente. Todos os isolados brasileiros agruparam com a linhagem epidêmica Kawasaki_2014, apresentando alta identidade nucleotídica (>99%) com as cepas do cluster, sugerindo que os vírus detectados no Brasil derivam da cepa mais recente, associada a epidemias na Ásia.

Os dados de filogeografia estimaram que a origem da variante Kawasaki_2014 é consistente com Guandong-China no ano de 2012. A análise estimou ainda que, ocorreram pelo menos quatro eventos de introdução independentes dessa linhagem no país ao longo do ano de 2014. Hong Kong - China, foi a provável fonte de origem da variante Kawasaki_2014 introduzida em Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Minas Gerais. A inferência filogeográfica estimou ainda uma segunda introdução da linhagem Kawasaki_2014 em Santa Catarina, tendo Guandong - China como a provável origem desta variante.

O período de introdução estimada da variante no país, coincide com o período em que ocorreu o evento da Copa do Mundo de 2014, ocasião em que uma grande quantidade de turistas nacionais e internacionais circularam pelo país, indicando que a nova variante pode ter sido introduzida por turistas neste período, facilitando a disseminação do vírus. A detecção da nova variante somente após quase um ano do período estimado, reforça a importância de se manter uma rede de vigilância epidemiológica dos norovírus no Brasil, assim como que se mantenha a constante investigação e caracterização desses vírus. Estudos filogenéticos e epidemiológicos podem auxiliar no melhor entendimento nos padrões de dispersão, evolução e susceptibilidade do hospedeiro aos norovírus e suas novas variantes.

5.2.2- Norovírus GII.17 associado a um surto de gastroenterite aguda de transmissão alimentar no Brasil, 2016 (Artigo 3).

Amostras de um surto de GA ocorrido no ano de 2016 após um almoço de celebração de posse do novo presidente do Rotary Club de Iturama, no estado de Minas Gerais (MG) foram enviadas ao LVCA para investigação de vírus gastroentéricos.

A análise filogenética das sequências parciais da RNA polimerase e do capsídeo viral, revelaram árvores filogenéticas de topologia similares, onde as cepas foram divididas em três linhagens diferentes em que os vírus mais antigos do genótipo GII.17, isolados nos anos de 1978 a 2002 agrupam no cluster II e os isolados de 2013 em diante se agrupam no cluster I, contendo as cepas mais recentes dos norovírus GII.17. O cluster I por sua vez, foi subdividido em duas sublinhagens, agrupando as cepas da fase epidêmica isoladas em 2014-2015 e as cepas isoladas na fase pré-epidêmica da variante Kawasaki_2014, contendo isolados de 2013 e 2014 agregadas no subcluster I. A topologia observada, corrobora a descrição prévia por alguns grupos de pesquisa que descreveram a divisão do GII.17 em uma linhagem mais antiga e a linhagem Kawasaki_2014 dividida em duas sublinhagens (Pu et al., 2016; Parra et al., 2017).

Os norovírus detectados nas amostras do surto de GA ocorrido em MG, agruparam com as cepas da linhagem epidêmica Kawasaki_2014 (cluster I) que circularam na Ásia durante a fase epidêmica. No mesmo subcluster,

agruparam outras cepas brasileiras detectadas em 2015 por Silva e colaboradores (2017) e também cepas de outros países, como Estados Unidos e Itália. Apesar de agrupar no cluster da linhagem Kawasaki_2014, a cepa argentina detectada no ano de 2015 agrupou externamente ao grupo principal, corroborando com estudos prévios (Degiuseppe et al, 2015). Esses dados indicam que a cepa brasileira detectada no surto alimentar ocorrido em MG pertence à nova variante Kawasaki_2014 do genótipo GII.17.

Esses vírus foram descritos pela primeira vez em casos esporádicos de GA em pacientes pediátricos internados, na região norte do Brasil (Silva et al., 2017). Ainda na América Latina, a variante Kawasaki foi associada a um caso esporádico de GA em um paciente pediátrico na Argentina (Degiuseppe et al., 2015). Esta é a primeira descrição da nova variante de GII.17 em casos de surto de GA no Brasil e na América Latina.

A rota alimentar é a principal via de transmissão dos norovírus em surtos de GA e alguns estudos descreveram a detecção da nova variante de GII.17 em água e ostras (Imamura et al. 2016; La Rosa et al. 2017). No Japão, o GII.17_Kawasaki foi o genótipo predominante detectado em ostras (Pu et al. 2016) e na Dinamarca, foi associado a um surto alimentar pelo consumo de ostras (Rasmussen et al. 2106). Na China, mais de 100 estudantes foram infectados com a nova variante de GII.17 ao consumirem bebidas com gelo contaminado (Cheng et al., 2017). Um surto alimentar de grandes proporções em uma unidade militar francesa, foi associado ao norovírus GII.17_Kawasaki (Sanchez et al., 2017).

Algumas limitações envolvidas em nosso estudo, principalmente no que diz respeito à restrição de informações mais detalhadas sobre o surto. Nenhum tipo de alimento foi coletado, o que nos impediu de investigar a presença de norovírus nos alimentos para associar à investigação com amostras clínicas. Além disso, não tivemos acesso aos pacientes e aos manipuladores de alimentos para investigar aspectos relativos ao surto como sintomas prévios de GA, os alimentos consumidos e taxa de ataque secundária do surto.

Nossos dados indicam que a nova variante do norovírus GII.17 Kawasaki_2014 foi associada ao surto de transmissão alimentar ocorrido durante um almoço de celebração onde pratos contendo diversos ingredientes

crus foram servidos. É provável que o surto tenha sido causado por alimento contaminado ou manipulação inadequada por indivíduo infectado com as mãos contaminadas. Esses dados reforçam a importância das medidas de prevenção como higiene pessoal adequada, restrição das atividades de manipuladores de alimentos com sintomas de GA e a desinfecção ambiental apropriada. Nos Estados Unidos, uma rede de vigilância online para surtos de origem alimentar causados por norovírus foi implementada em 2011 pelo CDC, centralizando as informações e facilitando a investigação desses surtos (Vega et al., 2011). Apesar de existirem instituições responsáveis pelo manejo de surtos de transmissão alimentar no Brasil, as informações pertinentes são pouco divulgadas e dispersas. Uma rede de vigilância de surtos de transmissão alimentar causados por norovírus poderia auxiliar na investigação e contenção desses surtos no Brasil.

5.2.3- Caracterização molecular e análise filogenética do genoma completo de norovírus GII.P17-GII.17 Kawasaki_2014 detectados no Brasil (Artigo 4)

A análise filogenética das sequências nucleotídicas completas das ORFs 1, 2 e 3 de 12 norovírus GII.17 Kawasaki_2014 detectados no Brasil, demonstrou a ramificação do norovírus GII.17 em três linhagens distintas, como observado nos dois estudos anteriores, corroborando com estudos prévios (Matsushima et al., 2015; Parra et al., 2017). Uma linhagem compreende cepas mais antigas, isoladas nos anos de 1978 a 2012 e outra linhagem com cepas de 1994 a 2000. A linhagem mais recente agrupou a nova variante dos norovírus GII.17 Kawasaki_2014, que por sua vez se divide em duas linhagens, uma consistindo dos isolados detectados na fase pré-epidêmica (2013-2014) e outra linhagem com os isolados detectados na fase epidêmica nos anos de 2014-2016. Todas as doze cepas brasileiras foram fortemente relacionadas com as cepas asiáticas mais recentes, isoladas de 2014-2016.

A análise das sequências aminoacídicas da proteína VP1 revelou que a maioria das alterações ocorreram a partir do ano de 2013, período em que a nova variante emergiu, sugerindo que esses vírus possuem grande capacidade evolutiva quando comparadas às linhagens anteriores. O

subdomínio P2 concentrou a maior parte das alterações aminoacídicas encontradas entre as diferentes cepas de GII.17. O subdomínio P2 é a região mais exposta da proteína VP1, onde ocorre a maior pressão seletiva exercida pelo sistema imune do hospedeiro, pois se concentram os principais epítomos, sítios antigênicos de ligação de anticorpos e também domínios de ligação com os receptores celulares. Cinco epítomos (I a V) presentes no subdomínio P2 da proteína VP1 são reconhecidos como os principais epítomos em norovírus (Lindesmith et al., 2008; Matsushima et al., 2015). Nossas análises demonstraram que as linhagens dos norovírus Kawasaki_2014 apresentaram alterações nesses epítomos, principalmente nos epítomos II a V. Encontramos duas alterações particulares entre as cepas brasileiras localizadas no epítomo V (N390I e H396N), que não foram observadas entre as outras cepas da mesma linhagem, o que sugere a diversificação antigênica dessas cepas durante sua circulação no país. Estudos prévios corroboram com os dados dessa análise, em que a maior parte das alterações aminoacídicas da proteína VP1 se concentram no subdomínio P2, o que confere a esses vírus alterações antigênicas permitindo evadir o sistema imune do hospedeiro.

Quando analisamos as sequências aminoacídicas da poliproteína não-estrutural das cepas brasileiras, detectamos substituições em sítios localizados na proteína N-terminal (D216E, T298I), NTPase (A403S) e na protease 3C-like (I1154M), proteínas envolvidas na replicação viral. Alterações em quatro resíduos na proteína VP2 (I33V; G73E; S123A; S129N) também foram observados entre as cepas brasileiras. Alterações aminoacídicas na poliproteína não-estrutural assim como na VP2 podem afetar a eficiência da replicação dos norovírus, o que está associado ao *fitness* viral (Hardy, 2005, Chan et al., 2017).

Nossos dados corroboram os estudos que apontam para a grande capacidade evolutiva dos norovírus, com o surgimento de uma nova variante de um genótipo raramente detectados anteriormente. Considerado um vírus de padrão de evolução estática, a partir da emergência da nova variante Kawasaki_2014, o norovírus GII.17 demonstrou habilidade de rápida evolução durante sua dispersão, com a diversificação genética em duas sublinhagens, compreendendo a variante pré-epidêmica detectada em 2013-2014 e a outra variante epidêmica detectada em 2014-2016. Ficou evidente que o padrão de

dispersão e diversificação genética da nova variante de GII.17 difere das variantes de GII.4, pois enquanto uma nova variante de GII.4 emerge a cada 3 a 8 anos, a nova variante de GII.17 rapidamente se diversificou em duas sublinhagens diferentes em menos de dois anos. Essas observações deixam evidentes as alterações no *fitness* viral deste genótipo quando comparamos as linhagens antigas com a nova variante. A aquisição de uma nova RNA polimerase pode estar associada à alteração do *fitness* viral, conferindo ao vírus maior vantagem adaptativa comparado às linhagens antigas, permitindo sua rápida evolução, evasão do sistema imune da população, facilitando sua dispersão (Lindesmith et al., 2008, Matsushima et al., 2015)

Nossas observações reforçam a necessidade de se manter um sistema de vigilância dos norovírus ativo no Brasil. Não menos importante, uma rede de vigilância nacional e internacional que possam auxiliar na investigação da dispersão, diversificação genética e evolução desses vírus. Desta forma, informações que podem auxiliar no desenvolvimento de uma vacina eficaz, uma vez que conhecer os genótipos e variantes circulantes em cada região contribui significativamente na formulação da vacina em construção contra os norovírus.

6- Conclusões

- Norovírus recombinantes foram associados a casos de surtos de GA entre 2004 e 2011 e, a grande diversidade destes vírus no Brasil foi caracterizada pela identificação de oito tipos de recombinantes diferentes: GII.P7/GII.6; GIIP.g/GII.12; GII.P16/GII.3; GII.Pe/GII.17; GII.P7/GII.14; GII.P13/GII.17; GII.P21/GII.3 e GII.P21/GII.13.

- Os norovírus GII.17 Kawasaki_2014 foram detectados pela primeira vez no Brasil no ano de 2015 em amostras de casos esporádicos de GA e agruparam-se no subcluster C-II, representados pelas cepas emergentes GII.P17-GII.17, detectadas na China, em Hong Kong durante 2014 e 2015, bem como cepas detectadas fora da Ásia, como cepas norte-americanas e italianas.

- Foi demonstrado que a circulação da linhagem Kawasaki_2014 é resultado de quatro eventos de introdução independentes no país no ano de 2014, sendo Hong Kong a fonte mais provável de origem desta variante.

-Foi demonstrado que após a introdução, a nova variante GII.P17-GII.17 Kawasaki_2014 foi também associada à um surto de GA por transmissão alimentar ocorrido em 2016.

-A rápida evolução e dispersão da variante de norovírus GII. 17 Kawasi_2014 evidencia a plasticidade e a rápida capacidade de evolução do norovírus GII.17, demonstrando que o surgimento de GII.17 Kawasaki é notavelmente diferente do padrão de emergência das variantes de GII.4.

- Apesar da alta similaridade com isolados mais recentes detectados na Ásia, a circulação dessa variante no Brasil levou à diversificação antigênica proporcionada por alterações aminoacídicas observadas somente nas cepas brasileiras.

-A caracterização de diferentes recombinantes de norovírus associados a surtos, assim como a detecção de uma variante emergente, demonstram a importância da caracterização molecular na vigilância epidemiológica contínua dos norovírus no Brasil, devido a rápida emergência e dispersão destes vírus e seu impacto em populações suscetíveis.

7- Perspectivas

A grande variabilidade genética e antigênica dos norovírus, assim como sua alta prevalência em casos de GA, principalmente em surtos, apontam para a necessidade de uma contínua vigilância epidemiológica desses vírus. Nesse sentido, enfatiza a manutenção de estudos de epidemiologia molecular, assim como a importância de se estabelecer uma rede de vigilância nacional para os norovírus, que possibilite o compartilhamento de informações sobre a eventual entrada e dispersão de novos genótipos recombinantes e/ou variantes no país. A vinculação com redes internacionais também se apresenta como uma estratégia na mitigação do impacto destes vírus em populações suscetíveis contribuindo de modo mais efetivo nas medidas de prevenção e controle de grandes surtos.

8- Referências Bibliográficas

- Adler JL, Zickl R. Winter vomiting disease. *J Infect Dis* 1969;119(6):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):725-730.
- Anderson AD, Garrett VD, Sobel J, Monroe SS, Fankhauser RL, Schwab KJ, Bresee JS, Mead PS, Higgins C, Campana J, Glass RI. Multistate outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis associated with a common caterer. *Am J Epidemiol* 2001; 154(11):1013–1019.
- Ando T, Mulders N, Lewis DC, Estes MK, Monroe SS, Glass RI. Comparison of the polymerase region of small round structured virus strain previously characterized in three serotypes by solid phase immune microscopy. *Arch Virol* 1994; 135(1-2):217-26.
- Andrade JSR, 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.
- 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, 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.
- Arvelo W, Sosa SM, Juliao P, López MR, Estevéz A, López B, Morales-Betoulle ME, González M, Gregoricus NA, Hall AJ, Vinje J, Parashar U, Lindblade KA. Norovirus outbreak of probable waterborne transmission with high attack rate in a Guatemalan resort. *J Clin Virol* 2012;55(1):8-11.
- 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, Graham DY. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 2008;14(10):1553-57.
- Baldrige MT, Nice TJ, McCune BT, Yokoyama CC, Kambal A, Wheadon M, Diamond MS, Ivanova Y, Artyomov M, Virgin HW. Commensal microbes and interferon- λ determine persistence of enteric murine norovirus infection. *Science* 2015;347(6219):266-9.
- Bányai K, Estes MK, Martella V, Parashar UD. Viral gastroenteritis. *Lancet* 2018;392(10142):175-186.
- Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect* 2004;58(1):42–49.
- 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- 4.
- Barreira DMPG, Fumian TM, Tonini MAL, Volpini LPB, Santos RP, Ribeiro ALC, Leite JPG, Souza MTBME, Brasil P, da Cunha DC, Miagostovich MP, Spano LC. Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016. *PLoS One* 2017;12(12):e0189504.
- Bernstein DI, Atmar RL, Lyon GM, et al. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: a challenge study in healthy adults. *J Infect Dis* 2015; 11(6): 870–78.
- Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 3J 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 viruses 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):721-24.

- Boxman IL, Tilburg JJ, Te Loeke NA, Vennema H, Jonker K, de Boer E, Koopmans M. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int J Food Microbiol*. 2006 May 1;108(3):391-6.

- Brinker JP, Blacklow NR, Jiang X, Estes MK, Moe CL, Herrmann JE. Immunoglobulin M antibody test to detect genogroup II Norwalk-like virus Infection. *J Clin Microbiol* 1999; 37(9):2983–86.

- Bruggink LD, Moselen JM, Marshall JA. The molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Victoria, 2014 to 2015. *Commun Dis Intell Q Rep* 2017;41(1):E21-E32.

-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, 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.

- Cannon JL, Lindesmith LC, Donaldson EF, Saxe L, Baric RS, Vinjé J. Herd immunity to GII.4 noroviruses is supported by outbreak patient sera. *J Virol* 2009; 83(11): 5363– 74.

- Cannon JL, Barclay L, Collins NR, Wikswo ME, Castro CJ, Magaña LC, Gregoricus N, Marine RL, Chhabra P, Vinjé J. Genetic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States from 2013 to 2016 Demonstrated Emergence of Novel GII.4 Recombinant Viruses. *J Clin Microbiol* 2017;55(7):2208-2221.

- Castilho JG, Munford V, Resque HR, Fagundes-Neto U, Vinjé 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 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; 62(3): 41–7.

- Chan MC, Lee N, Hung TN, Kwok K, Cheung K, Tin EK, Lai RW, Nelson EA, Leung TF, Chan PK. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nat Commun* 2015;6:10061.

- Chan MCW, Hu Y, Chen H, Podkolzin AT, Zaytseva EV, Komano J, Sakon N, Poovorawan Y, Vongpunsawad S, Thanusuwannasak T, Hewitt J, Croucher D, Collins N, Vinjé J, Pang XL, Lee BE, de Graaf M, van Beek J, Vennema H, Koopmans MPG, Niendorf S, Poljsak-Prijatelj M, Steyer A, White PA, Lun JH, Mans J, Hung TN, Kwok K, Cheung K, Lee N, Chan PKS. Global Spread of Norovirus GII.17 Kawasaki 308, 2014-2016. *Emerg Infect Dis* 2017;23(8):1359-1354.

- Cheesbrough JS, Barkess-Jones L, Brown DW. Possible prolonged environmental survival of small round structured viruses. *J Hosp Infect* 1997;35(4):325-6.

- Cheng HY, Hung MN, Chen WC, Lo YC, Su YS, Wei HY, Chen MY, Tuan YC, Lin C, Lin HY, Liu TY, Wang YY, Wu FT. Ice-associated norovirus outbreak predominantly caused by GII.17 in Taiwan, 2015. *BMC Public Health* 2017;17(1):870.

-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(4):249-54.

-Clarke IN, Estes MK, Green KY, Hansman GS, Knowles NJ, Koopmans MK, Matson DO, Meyers G, Neill JD, Radford A, Smith AW, Studdert MJ, Thiel HJ, Vinjé, J. Caliciviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King, A.M.Q., Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ pp 977-986. San Diego: Elsevier 2011.

- Cooper E, Blamey S. A norovirus gastroenteritis epidemic in a long-term-care facility. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26(3):256 –258.

- Cortes-Penfield NW, Ramani S, Estes MK, Atmar RL. Prospects and Challenges in the Development of a Norovirus Vaccine. *Clin Ther* 2017;39(8):1537-1549.
- Cubitti WD, McSwiggan DA, Moore W. Winter vomiting disease caused by calicivirus. *J Clin Patol* 1979; 32(8): 786-93.
- Cuevas JM, Combe M, Torres-Puente M, Garijo R, Guix S, Buesa J, Rodríguez-Díaz J, Sanjuán R. Human norovirus hyper-mutation revealed by ultra-deep sequencing. *Infect Genet Evol* 2016;41:233-239.
- Currier RL, Payne DC, Staat MA, Selvarangan R, Shirley SH, Halasa N, Boom JA, Englund JA, Szilagyi PG, Harrison CJ, Klein EJ, Weinberg GA, Wikswo ME, Parashar U, Vinjé J, Morrow AL. Innate Susceptibility to Norovirus Infections Influenced by FUT2 Genotype in a United States Pediatric Population. *Clin Infect Dis* 2015;60(11):1631-8.
- Debbink K, Lindesmith LC, Baric RS. The state of norovirus vaccines. *Clin Infect Dis* 2014;58(12):1746-52.
- Degiuseppe JI, Gomes KA, Hadad MF, Parra GI, Stupka JA. Detection of novel GII.17 norovirus in Argentina, 2015. *Infect Genet Evol.* 2017 Jan;47:121-124.
- 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.
- Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Formal S, Buscho RF, Kasel JA, Chames RP, Hornick R, Chanock RM. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis* 1971; 123(3): 307-12.
- Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA, Hornick R, Chanock RM. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972; 140(2): 184-89.
- Domènech-Sánchez A, Juan C, Rullan AJ, Pérez JL, Berrocal CI. Gastroenteritis outbreaks in 2 tourist resorts, Dominican Republic. *Emerg Infect Dis* 2009;15(11):1877-8.
- 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.

- Duizer E, Kroneman A, Siebenga J, Verhoef L, Vennema H, Koopmans M, the FBVE network. Typing database for noroviruses. *Eurosurveillance* 2008;13(19).
- Eden, J. S., Tanaka, M. M., Boni, M. F., Rawlinson, W. D. & White, P. A. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J Virol* 2013; 87:6270–6282.
- EPA, Environmental Protection Agency. 2018. [Capturado novembro 2018] Disponível em <https://www.epa.gov/>
- Estes MK, Prasad BV, Atmar RL. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19(5):467-74.
- 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.
- Ferreira MS, Garcia RCC, Xavier MPTP, Ribeiro RL, Assis RM, Mota MCMS, Leite JPG, Miagostovich MP, Oliveira AS. Genotyping of gastroenteric viroses in hospitalized children: first report of norovirus GII.21 in Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(8):1064-1067.
- 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):942-47.

- Fioretti JM, Bello G, Rocha MS, Victoria M, Leite JP, Miagostovich MP. Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS One* 2014;9(3):e92988.
- Frange P, Touzot F, Debré M, Héritier S, Leruez-Ville M, Cros G, Rouzioux C, Blanche S, Fischer A, Avettand-Fenoël V. Prevalence and clinical impact of norovirus fecal shedding in children with inherited immune deficiencies. *J Infect Dis* 2012; 206(8):1269-74.
- Fretz R. How important is the norovirus relationship to gastroenteritis. *Wien Klin Wochenschr* 2005; 177(23-24):785-88.
- Gabbay YB, Glass RI, Monroe SS, Carcamo C, Estes MK, Mascarenhas JD, Linhares AC. 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.
- García C, DuPont HL, Long KZ, Santos JI, Ko G. Asymptomatic norovirus infection in Mexican children. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8): 2997-3000.
- Georgiadis S, Pilger DA, Pereira F, Cantarelli VV. Molecular evaluation of norovirus in patients with acute gastroenteritis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010;43(3):277-80.
- Giammanco GM, De Grazia S, Bonura F, Cappa V, Muli SL, Pepe A, Medici MC, Tummolo F, Calderaro A, Di Bernardo F, Dones P, Morea A, Loconsole D, Catella C, Terio V, Bányai K, Chironna M, Martella V. Norovirus GII.17 as Major Epidemic Strain in Italy, Winter 2015-16. *Emerg Infect Dis* 2017;23(7):1206-1208.
- Glass RI, Parashar, UD, Estes MK. Norovirus Gastroenteritis. *N Engl J Med* 2009;361(18):1776-85.
- Green KY, Belliot G, Taylor JL, Valdesuso J, Lew JF, Kapikian AZ, Lin FY. 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: the noroviruses In: Knipe DM, Hoely PM, Cohen JJ, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA,

Racaniello VR, Roizman B, editors. *Fields Virology*. 6th ed, vol.1 Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p582-608. 2013.

-Green KY. Norovirus surveillance comes of age: the impact of NoroNet. *Lancet Infect Dis* 2018;18(5):482-483.

- Greenberg H B, Kapikian AZ. Detection of Norwalk agent antibody and antigen by solid-phase radioimmunoassay and immune adherence hemagglutination assay. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 173(5 pt2):620–23.

- 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(1):34-43.

- Gondim RDG, Pankov RC, Prata MMG, Medeiros PHQS, Veras HN, Santos AKS, Magalhães LMC, Havt A, Fumian TM, Miagostovich MP, Leite JPG, Lima AAM. Genetic Diversity of Norovirus Infections, Co-Infections, and Undernutrition in Children from Brazilian Semiarid Region. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018; 6.

- Guo L, Wang J, Zhou H, Si H, Wang M, Song J, Han B, Shu Y, Ren L, Qu J, Hung T. Intranasal administration of a recombinant adenovirus expressing the norovirus capsid protein stimulates specific humoral, mucosal, and cellular immune responses in mice. *Vaccine* 2008;26(4):460-8.

- Godoy P, Alsedà M, Bartolomé R, Clavería D, Módol I, Bach P, Mirada G, Domínguez À. Norovirus gastroenteritis outbreak transmitted by food and vomit in a high school. *Epidemiol Infect* 2016;144(9):1951-8.

-Greenberg HB, Valdesuso JR, Kalica AR, Wyatt RG, McAuliffe VJ, Kapikian AZ Chanock RM. Proteins of Norwalk virus. *J Virol* 1981; 37(3):994-99.

-Hardy ME, Estes MK. Completion of the Norwalk virus genome sequence. *Virus Genes* 1996; 12(3):289-92.

- Hall AJ, Rosenthal M, Gregoricus N, Greene SA, Ferguson J, Henao OL, Vinje 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):1381-88.

- Hall AJ, Lopman BA, Payne DC, Patel MM, Gastañaduy PA, Vinje J, Parashar UD. Norovirus disease in the United States. *Emerg Infect Dis* 2013;19(8):1198-205.

- Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 253(1):1-8
- Harris JP, Edmunds WJ, Pebody R, Brown DW, Lopman BA. Deaths from norovirus among the elderly, England and Wales. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(10):1546-52.
- Hasman GS, Doan LT, K Nguyen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Noda M, Ushijima H. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch Virol* 2004; 149(9):1673-88.
- Hernandez JDM, Silva LDD, Sousa EC Junior, Lucena MSS, Soares LDS, Mascarenhas JDP, Gabbay YB. Analysis of uncommon norovirus recombinants from Manaus, Amazon region, Brazil: GII.P22/GII.5, GII.P7/GII.6 and GII.Pg/GII.1. *Infect Genet Evol* 2016;39:365-371.
- Hu D, Zhu C, Wang Y, Ai L, Yang L, Ye F, Ding C, Chen J, He B, Zhu J, Qian H, Xu W, Feng Y, Tan W, Wang C. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bats from Southeast China. *Sci Rep* 2017; 7:10917.
- Huang XY, Su J, Lu QC, Li SZ, Zhao JY, Li ML, Li Y, Shen XJ, Zhang BF, Wang HF, Mu YJ, Wu SY, Du YH, Liu LC, Chen WJ, Klena JD, Xu BL. A large outbreak of acute gastroenteritis caused by the human norovirus GII.17 strain at a university in Henan Province, China. *Infect Dis Poverty* 2017;6(1):6.
- Huynen P, Mauroy A, Martin C, Savadogo LG, Boreux R, Thiry E, Melin P, De Mol P. Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *J Clin Virol* 2013;58(3):515-21.
- Imamura S, Haruna M, Goshima T, Kanezashi H, Okada T, Akimoto K. Application of next-generation sequencing to investigation of norovirus diversity in shellfish collected from two coastal sites in Japan from 2013 to 2014. *Jpn J Vet Res* 2016;64(2):113-22.
- Iritani N, Seto Y, Kubo H, Haruki K, Ayata M, Ogura H. Prevalence of “Norwalk-like virus” infections in outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis observed during the 1999–2000 season in Osaka City, Japan. *J Med Virol* 2002; 66(1):131–38.

- Ji L, Chen L, Xu D, Wu X, Han J. Nearly complete genome sequence of one GII.17 Norovirus identified by direct sequencing from HuZhou, China. *Mol Genet Genomic Med* 2018;6(5):796-804.
- Jiang X, Graham DY, Wang K, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 1990; 250(4987): 1580-83.
- Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK. Expression, self-assembly, and antigenicity of Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992; 66(11): 6527-32.
- Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 1993; 195(1): 51-61.
- Jiang X, Wilton N, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, Barret E, Guerrero M, RuizPalacios G, Green KY, Green J, Hale AD, Estes MK, Pickering LK, Matson DO. Diagnosis of human caliciviruses by use of Enzyme immunoassays. *J Infect Dis* 2000; 181(S2): 349-59.
- Jimenez L, Chiang M. Virucidal activity of a quaternary ammonium compound disinfectant against feline calicivirus: a surrogate for norovirus. *Am J Infect Control* 2006; 34:269 –273.
- 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.
- Kanamori H, Weber DJ, Gergen MF, DiBiase LM, Sickbert-Bennett EE, Rutala WA. Epidemiologic characteristics of health care-associated outbreaks and lessons learned from multiple outbreak investigations with a focus on the usefulness of routine molecular analysis. *Am J Infect Control* 2018;46(8):893-898.
- 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.
- Kapikian AZ, Greenberg HB, Cline WL, Kalica AR, Wyatt RG, James Jr HD, Lloyd NL, Chanock RM, Ryder RW, Kim HW. Prevalence of antibody to the Norwalk agent by a newly developed immune adherence hemagglutination assay. *J Med Virol* 1978; 2(4):281–94.
- Karst SM. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses* 2010; 2(3):748-81.

- Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleeschauwer B, Döpfer D, Fazil A, Fischer-Walker CL, Hald T, Hall AJ, Keddy KH, Lake RJ, Lanata CF, Torgerson PR, Havelaar AH, Angulo FJ. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Med* 2015;12(12):e1001921.
- Kocher JF, Lindesmith LC, Debbink K, Beall A, Mallory ML, Yount BL, Graham RL, Huynh J, Gates JE, Donaldson EF, Baric RS. Bat Caliciviruses and Human Noroviruses Are Antigenically Similar and Have Overlapping Histo-Blood Group Antigen Binding Profiles. *MBio*. 2018;9(3). pii: e00869-18.
- Kojima S, Kaheyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K, Natori K, Takeda N, Katayama K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Vir Methods* 2002; 100(1-2): 107–14.
- 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.
- La Rosa G, Fontana S, Di Grazia A, Iaconelli M, Pourshaban M, Muscillo M. Molecular identification and genetic analysis of Norovirus genogroups I and II in water environments: comparative analysis of different reverse transcription-PCR assays. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(13):4152-61.
- La Rosa G, Della Libera S, Iaconelli M, Proroga YTR, De Medici D, Martella V, Suffredini E. Detection of Norovirus GII.17 Kawasaki 2014 in Shellfish, Marine Water and Underwater Sewage Discharges in Italy. *Food Environ Virol* 2017;9(3):326-333.
- Le Pendu, J., Ruvoen-Clouet, N., Kindberg, E.& Svensson, L. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin Immunol* 2006;18(6): 375–386.
- Lim KL, Eden JS, Oon LL, White PA. Molecular epidemiology of norovirus in Singapore, 2004– 2011. *J Med Virol* 2013;85(10):1842–51.
- Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, LePendou J, Baric R. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med* 2003; 9(5):548–53.

- Lindesmith L, Moe C, Lependu J, Frelinger JA, Treanor J, Baric RS. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *J Virol* 2005; 79(5):2900-09.
- 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.
- Lindesmith LC, Ferris MT, Mullan CW, et al. Broad blockade antibody responses in human volunteers after immunization with a multivalent norovirus VLP candidate vaccine: immunological analyses from a phase I clinical trial. *PLoS Med* 2015; 12(3):e1001807.
- Lindesmith LC, Kocher JF, Donaldson EF, Debbink K, Mallory ML, Swann EW, Brewer-Jensen PD, Baric RS. Emergence of Novel Human Norovirus GII.17 Strains Correlates With Changes in Blockade Antibody Epitopes. *J Infect Dis* 2017;216(10):1227-1234.
- Lopman BA, Brown DW, Koopmans M. Human Calicivirus in Europe. *Journal of Clinical Virology*. 2002; 24(3): 137-60.
- Lopman B. Air Sickness: Vomiting and Environmental Transmission of Norovirus on Aircraft *Clinical Infectious Diseases* 2011; 53(6):521–22.
- Lopman B, Gastañaduy P, Park GW, Hall AJ, Parashar UD, Vinje J. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Curr Opin Virol* 2012; 2(1):96-102.
- Lysén M, Thorhagen M, Brytting M, Hjertqvist M, Andersson Y, Hedlund KO. Genetic diversity among food-borne and waterborne norovirus strains causing outbreaks in Sweden. *J Clin Microbiol* 2009;47(8):2411-8.

- Lu J, Sun L, Fang L, Yang F, Mo Y, Lao J, Zheng H, Tan X, Lin H, Rutherford S, Guo L, Ke C, Hui L. Gastroenteritis Outbreaks Caused by Norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014-2015. *Emerg Infect Dis* 2015;21(7):1240-2.
- Lu J, Fang L, Zheng H, Lao J, Yang F, Sun L, Xiao J, Lin J, Song T, Ni T, Raghwani J, Ke C, Faria NR, Bowden TA, Pybus OG, Li H. The Evolution and Transmission of Epidemic GII.17 Noroviruses. *J Infect Dis* 2016;214(4):556-64.
- MacCannell T, Umscheid CA, Agarwal RK, Lee I, Kuntz G, Stevenson KB. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee-HICPAC. Guideline for the prevention and control of norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011;32(10):939-69.
- Madeley CR, Cossgrave BP. Letter: Calicivirus in man. *Lancet* 1976; 1(7952):199-200.
- Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, Nagasawa K, Kimura H, Ryo A, Okabe N, Haga K, Doan YH, Katayama K, Shimizu H. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Euro Surveill* 2015;20(26).
- Matsushima Y, Shimizu T, Ishikawa M, Komane A, Okabe N, Ryo A, Kimura H, Katayama K, Shimizu H: Complete genome sequence of a recombinant GII.P16-GII.4 norovirus detected in Kawasaki City, Japan, in 2016. *Genome Announc* 2016;4:e01099-16.
- McCall J, Smithson R. Rapid response and strict control measures can contain a hospital outbreak of Norwalk-like virus. *Commun Dis Public Health* 2002;5(3):243–246.
- Matthews RE. Third report of International Comitee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirolgy* 1979; 12(3-5):129-296.
- Matthews JE, Dickey BW, Miller RD, Felzer JR, Dawson BP, Lee AS, Rocks JJ, Kiel J, Montes JS, Moe CL, Eisenberg JN, Leon JS.The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup.*Epidemiol Infect* 2012;140(7):1161-72.

- Mattner F, Sohr D, Heim A, Gastmeier P, Vennema H, Koopmans M. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(1):69-74.
- Medici MC, Tummolo F, Calderaro A, Chironna M, Giammanco GM, De Grazia S, Arcangeletti MC, De Conto F, Chezzi C, Martella V. Identification of the novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy, 2015. *Euro Surveill* 2015;20(35):30010.
- Meeroff JC, Schreiber DS, Trier JS, Blacklow NR. Abnormal gastric motor function in viral gastroenteritis. *Ann Intern Med* 1980;92(3):370-3.
- Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ, Thumfart JO. Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* 2000; 276:349-363.
- Monedero V, Buesa J, Rodríguez-Díaz J. The Interactions between Host Glycobiology, Bacterial Microbiota, and Viruses in the Gut. *Viruses* 2018;10(2).
- Morillo SG, Luchs A, Cilli A, do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky M. Rapid detection of norovirus in naturally contaminated food: foodborne gastroenteritis outbreak on a cruise ship in Brazil, 2010. *Food Environ Virol* 2012;4(3):124-9.
- Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Ribeiro CD, de Cássia Compagnoli Carmona R, do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky M. Norovirus GII.Pe Genotype: Tracking a Foodborne Outbreak on a Cruise Ship Through Molecular Epidemiology, Brazil, 2014. *Food Environ Virol* 2017;9(2):142-148.
- Mouchtouri VA, Verykoui E, Zamfir D, Hadjipetris C, Lewis HC, Hadjichristodoulou C; The Eu Shipsan Act Partnership. Gastroenteritis outbreaks on cruise ships: contributing factors and thresholds for early outbreak detection. *Euro Surveill* 2017;22(45).
- Nilsson M, Hedlund K, Thorhagen M, Johansen K. Evolution of Human Calicivirus RNA *In Vivo*: Accumulation of Mutations in the Protruding P2 Domain of the Capsid Leads to Structural Changes and Possibly a New Phenotype. *J Virol* 2003;77(24):13117-24.
- Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, Estes MK, Seto Y, Monroe S, Glass RI. Correlation of patient immune responses with genetically characterized Small Round-Structured Viruses involved in outbreaks of

nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990-1995. *J Med Virol* 1997; 53(4): 372–83.

- NORS, National Outbreak Reporting System. 2018. [Capturado novembro 2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/nors/about.html>.

- Pang XL, Preiksaitis JK, Lee B. Multiplex Real Time RT-PCR for detection and quantitation of norovirus genogroups I and II inpatients with acute gastroenteritis. *J Clin Virol* 2005; 33(2):168-71.

- Park GW, Williamson KJ, DeBess E, Cieslak PR, Gregoricus N, De Nardo E, Fricker C, Costantini V, Vinjé J. High Hand Contamination Rates During Norovirus Outbreaks in Long-Term Care Facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2018;39(2):219-221.

- Parra GI, Green KY. Genome of Emerging Norovirus GII.17, United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 2015; 21(8):1477–9.

- Parra GI, Squires RB, Karangwa CK, Johnson JA, Lepore CJ, Sosnovtsev SV, Green KY. Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog* 2017;13(1):e1006136.

- 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.

- Phillips G, Tam CC, Rodrigues LC, Lopman B. Risk factors for symptomatic and asymptomatic norovirus infection in the community. *Epidemiol Infect* 2010; 139(11):1676-86.

- Phumpholsup T, Theamboonlers A, Wanlapakorn N, Felber JA, Suvaporn Anugulruengkit, Puthanakit T, Chomto S, Payungporn S, Poovorawan Y. Norovirus outbreak at a daycare center in Bangkok, 2014. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2015;46(4):616-23.

-Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes M K. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 1999; 286(5438):287-90.

- Pu J, Kazama S, Miura T, Azraini ND, Konta Y, Ito H, Ueki Y, Cahyaningrum EE, Omura T, Watanabe T. Pyrosequencing Analysis of Norovirus Genogroup

II Distribution in Sewage and Oysters: First Detection of GII.17 Kawasaki 2014 in Oysters. *Food Environ Virol* 2016;8(4):310-312.

-Ramani S, Neill FH, Opekun AR, Gilger MA, Graham DY, Estes MK, Atmar RL. Mucosal and Cellular Immune Responses to Norwalk Virus. *J Infect Dis* 2015;212(3):397-405.

- Rasmussen LD, Schultz AC, Uhrbrand K, Jensen T, Fischer TK. Molecular Evidence of Oysters as Vehicle of Norovirus GII.P17-GII.17. *Emerg Infect Dis* 2016;22(11):2024-2025.

- 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.

- Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, Miagostovich MP, Spano LC. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103(2):201-06.

- Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, Cotterill H, Ratcliffe S, Jenkins M, Appleton H, Gallimore CI, Gray JJ, Brown DW. Evaluation of commercial Elisa for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol* 2003; 26(1):109-15.

- Richardson, C., Bargatze, R. F., Goodwin, R. & Mendelman, P. M. Norovirus virus-like particle vaccines for the prevention of acute gastroenteritis. *Expert Rev. Vaccines* 2013;12, 155–167

-Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):134-64.

- Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinje J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, Koopmans M. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2002;35(3):246–53.

- 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* 2005;77(3):439–46.

- Rolfe KJ, Parmar S, Mururi D, Wreghitt TG, Jalal H, Zhang H, Curran MD. An internally controlled, one-step, real-time RT-PCR assay for norovirus detection and genogrouping. *J Clin Virol* 2007;39(4):318-21.

- Sanchez MA, Corcostégui SP, De Broucker CA, Cabre O, Watier-Grillot S, Perelle S, Ambert-Balay K, Pommier de Santi V. Food Environ Virol 2017;9(2):234-237.
- 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.
- Schultz AC, Vega E, Dalsgaard A, Christensen LS, Nørrung B, Hoorfar J, Vinjé J. Development and evaluation of novel one-step TaqMan realtime RT-PCR assays for the detection and direct genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Clin Virol* 2011; 50(3):230-34.
- Schwartz S, Vergoulidou M, Schreier E, Loddenkemper C, Reinwald M, Schmidt-Hieber M, Flegel WA, Thiel E, Schneider T. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2011;117(22):5850-6.
- Scipioni A, Mauroy A, Vinjé J, Thiry E. Review Animal noroviruses. *Vet J* 2008; 178(1):32-45.
- Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, Ho EC, Lim W, Choudekar A, Broor S, Halperin T, Rasool NB, Hewitt J, Greening GE, Jin M, Duan ZJ, Lucero Y, O'Ryan M, Hoehne M, Schreier E, Ratcliff RM, White PA, Iritani N, Reuter G, Koopmans M. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis* 2009; 200(5):802-12.
- Silva LD, Bandeira RD, Junior EC, Lima IC, da Penha Júnior ET, Teixeira DM, Siqueira JA, Resque HR, de Abreu Campos EM, Justino MC, Linhares AC, Gabbay YB. Detection and genetic characterization of the emergent GII.17_2014 norovirus genotype among children with gastroenteritis from Northern Brazil. *Infect Genet Evol* 2017;48:1-3.
- Simon A, Schildgen O, Maria Eis-Hubinger A, Hasan C, Bode U, Buderus S, Engelhart S, Fleischhack G. Norovirus outbreak in a pediatric oncology unit. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41(6):693–99.
- Siqueira JAM, Bandeira RDS, Oliveira DS, Dos Santos LFP, Gabbay YB. Genotype diversity and molecular evolution of noroviruses: A 30-year (1982-

2011) comprehensive study with children from Northern Brazil. PLoS One 2017;12(6):e0178909.

- 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.

- 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.

- Swanstrom J, Lindesmith LC, Donaldson EF, Yount B, Baric RS. Characterization of blockade antibody responses in GII.2.1976 Snow Mountain virus-infected subjects. J Virol 2014;88(2):829-37.

- Talal AH, Moe CL, Lima AA, Weigle KA, Barret L, Bangdieala SE, Estes MK, Guerant RL. Soroprevalence and seroincidence of Norwalk-like virus infection among Brazilian infants and children. J Med Virol 2000; 61(1):117-24.

-Tan M, Jiang X. The P Domain of Norovirus Capsid Protein Forms a Subviral Particle That Binds to Histo-Blood Group Antigen Receptors. J Virol 2005; 79(22):14017–30.

-Tan M, Jiang X. Norovirus-host interaction: implications for disease control and prevention. Expert Rev Mol Med 2007;9(19):1-22.

-Tan M, Fang P, Chachiyo T, et al. Noroviral P particle: structure, function and applications in virus-host interaction. Virology 2008; 382(1):115–23.

- 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.

- Thornley CN, Emslie NA, Sprott TW, Greening GE, Rapana JP. Recurring norovirus transmission on an airplane. Clin Infect Dis 2011;53(6):515-20.

- Thorven M, Grahn A, Hedlund KO, Johansson H, Wahlfrid C, Larson G, Svensson L. A homozygous nonsense mutation (428G-->A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. J Virol 2005;79(24):15351-5.

- Timenetsky Mdo C, Kisielius JJ, Grisi SJ, Escobar AM, Ueda M, Tanaka H. Rotavirus, adenovirus, astrovirus, calicivirus and small round virus particles in

feces of children with and without acute diarrhea, from 1987 to 1988, in the greater São Paulo. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1993;35(3):275-80.

- Troeger H, Loddenkemper C, Schneider T, Schreier E, Epple HJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut* 2009; 58(8):1070-77.

- Vega E, Vinjé J. Novel GII.12 norovirus strain, United States, 2009-2010. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(8):1516-18.

- Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol* 2002;25(2):233-5.

- Verhoef L, Vennema H, van Pelt W, Lees D, Boshuizen H, Henshilwood K, Koopmans M. Use of norovirus genotype profiles to differentiate origins of foodborne outbreaks. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(4):617-24.

- Verhoef L, Hewitt J, Barclay L, Ahmed SM, Lake R, Hall AJ, Lopman B, Kroneman A, Vennema H, Vinjé J, Koopmans M. Norovirus genotype profiles associated with foodborne transmission, 1999-2012. *Emerg Infect Dis* 2015;21(4):592-9.

- 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.

- Vinjé J, Koopmans MP. Molecular detection and epidemiology of small roundstructured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996; 174(3):610-15.

- Vinjé 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 (2):373–81.

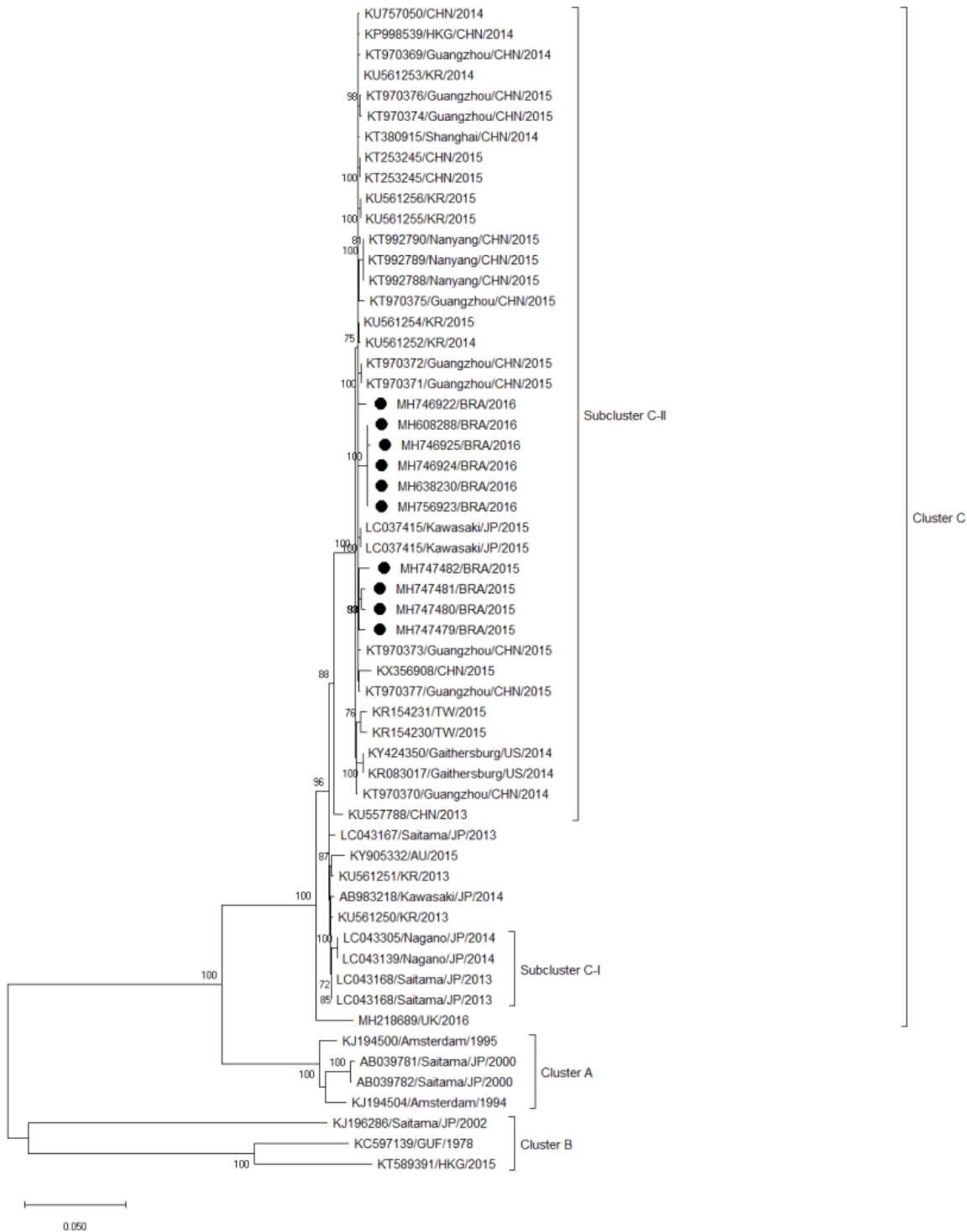
-Zahorsky, J. Hyperemesis hemis or the winter vomiting disease. *Arch Pediatr* 1929; 46:391–95.

-Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006; 346(2):312–23.

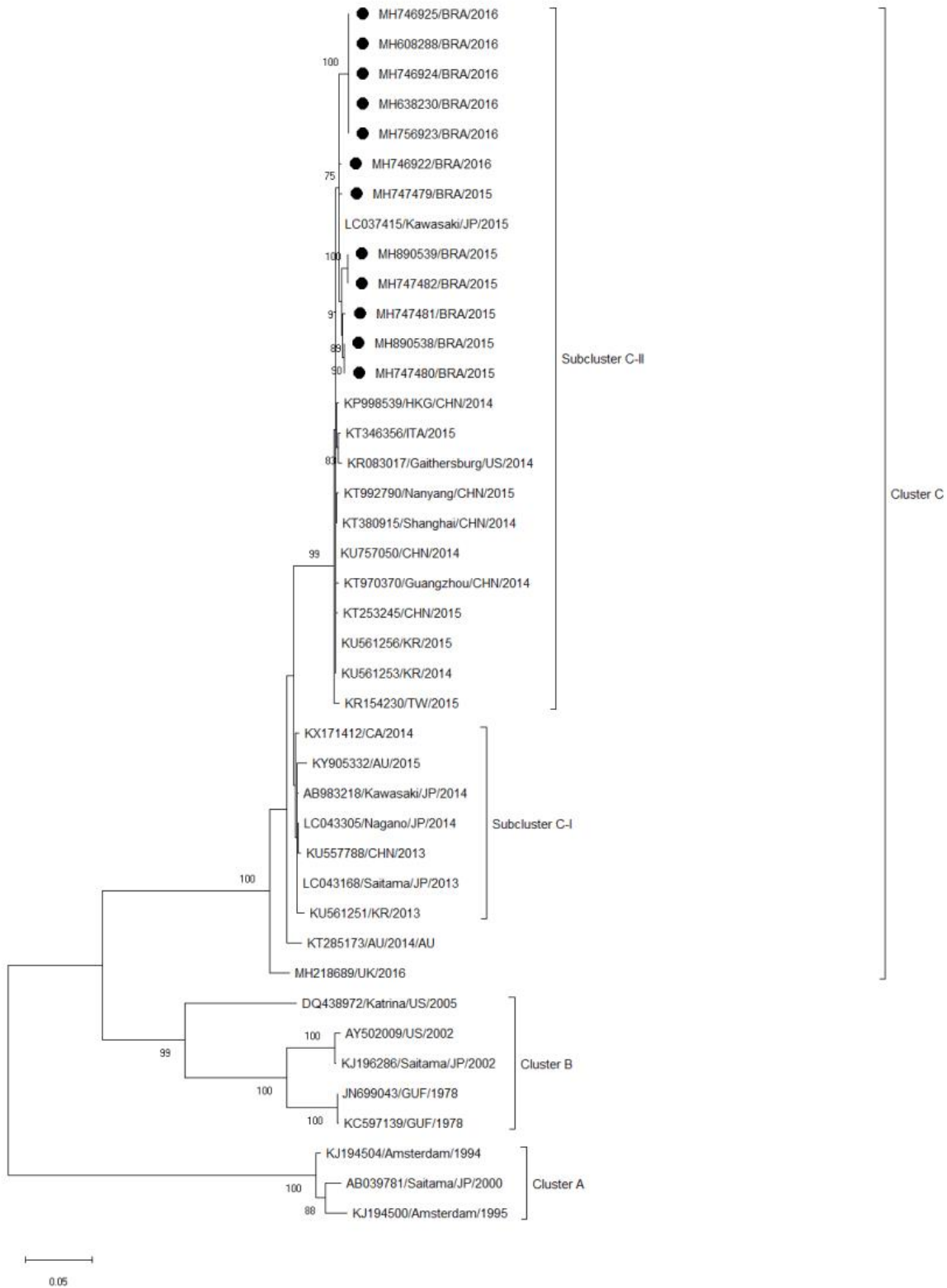
- Zheng DP, Widdowson MA, Glass RI, Vinjé J. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J Clin Microbiol* 2010; 48(1):168-77.
- Wang Y, Hao L, Pan L, Xue C, Liu Q, Zhao X, Zhu W. Age, primary symptoms, and genotype characteristics of norovirus outbreaks in Shanghai schools in 2017. *Sci Rep* 2018;8(1):15238.
- White PA. Evolution of norovirus. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Aug;20(8):741-5.
- Wingfield T, Gallimore CI, Xerry J, Gray JJ, Klapper P, Guiver M, Blanchard TJ. Chronic norovirus infection in an HIV-positive patient with persistente diarrhoea: a novel cause. *J Clin Virol* 2010;49(3):219-22.
- Wolf S, Williamson WM, Hewitt J, Rivera-Aban M, Lin S, Ball A, Scholes P, Greening GE. Sensitive multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal noroviruses in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(17):5464-70.

9- Anexos

9.1-Figura 1 do artigo 4: árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica completa da poliproteína não-estrutural (ORF-1) dos norovírus do genótipo GII.17 genotype, construída com o uso do método de *maximum-likelihood* e *bootstrap* de 1.000 réplicas. Valores de *Bootstrap* > 70% estão indicados nos nós da árvore. As cepas brasileiras estão marcadas com o um ponto preto.



9.2-Figura 2 do artigo 4.4: árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica completa da proteína VP1 (ORF-2) dos norovírus do genótipo GII.17 genotype, construída com o uso do método de *maximum-likelihood* e *bootstrap* de 1.000 réplicas. Valores de *Bootstrap* > 70% estão indicados nos nós da árvore. As cepas brasileiras estão marcadas com o um ponto preto.



9.3-Figura 3 do artigo 4.4: árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica completa da proteína VP2 (ORF-3) dos norovírus do genótipo GII.17 genotype, construída com o uso do método de *maximum-likelihood* e *bootstrap* de 1.000 réplicas. Valores de *Bootstrap* > 70% estão indicados nos nós da árvore. As cepas brasileiras estão marcadas com o um ponto preto.

