

Universidade Federal do Espírito Santo
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas

Debora Maria Pires Gonçalves Barreira

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE NOROVÍRUS EM INDIVÍDUOS
COM DIARREIA AGUDA: UMA ANÁLISE TEMPORAL**

Vitória – ES

2019

Debora Maria Pires Gonçalves Barreira

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE NOROVÍRUS EM INDIVÍDUOS
COM DIARREIA AGUDA: UMA ANÁLISE TEMPORAL**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Liliana Cruz Spano

Vitória – ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

B271d Barreira, Debora Maria Pires Gonçalves, 1981-
Diversidade genética de Norovírus em indivíduos com diarreia aguda: uma análise temporal / Debora Maria Pires Gonçalves Barreira. - 2019.
86 f. : il.

Orientadora: Liliana Cruz Spano.
Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Gastroenterite. 2. Biologia molecular. I. Spano, Liliana Cruz. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61




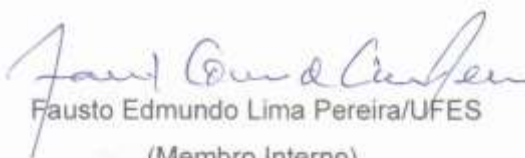
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE TESE DE DOUTORADO

A doutoranda Débora Maria Pires Gonçalves Barreira apresentou a tese intitulada "DIVERSIDADE GENÉTICA DE NOROVÍRUS EM INDIVÍDUOS COM DIARREIA AGUDA" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Doutor(a) em Doenças Infecciosas do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (✓) aprovar () reprovar a tese habilitando Débora Maria Pires Gonçalves Barreira a obter o grau de doutor(a) em doenças infecciosas.

Vitória - ES, 25 de outubro de 2019.


Moisés Palaci/UFES
(Membro Interno)


Fausto Edmundo Lima Pereira/UFES
(Membro Interno)


Túlio Machado Fumian/FIOCRUZ-RJ
(Membro Externo)


Rita Elizabeth Checon de Freitas Silva/UFES
(Membro Externo)

*Aos meus queridos filhos, Laura e Vitor, quando olho para
vocês posso perceber a magnitude do amor de Deus por mim.*

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pelo infinito amor e bondade, por me dar as forças que nem eu sabia que poderia ter, por me dar coragem para enfrentar desafios aparentemente intransponíveis;
- À Liliana, minha orientadora, manifesto profunda gratidão pelo auxílio, confiança, ensinamentos e paciência. Admiro sua fé em Deus, sua capacidade intelectual e seu rigor científico;
- Aos amigos do LabVir, Laís, Luciana, Marco André, Izabella, Taiz, Caroline, Núbia, pela generosidade e competência, parte desta conquista devo a vocês;
- Ao Dr Túlio Machado Fumian, grande referência em norovírus no Brasil, pela disponibilidade, simplicidade e apoio em todos os momentos que precisei;
- Aos meus pais maravilhosos, por tanto amor, por tantas orações, por meio das quais sou sustentada todos os dias (e noites de trabalho), por me ensinarem o valor do estudo, apesar de não terem tido a mesma oportunidade no passado. Também aos meus irmãos, Adriano e Gustavo, pelo amor e pela torcida;
- Ao meu marido Thiago pelo amor, cumplicidade, encorajamento e presença incansável ao meu lado nos momentos mais difíceis;
- À pediatra Alba Lilia, coordenadora da vigilância epidemiológica do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, por ter nos recebido com tanta disposição e às crianças do pronto socorro, sem as quais não seria possível a execução deste trabalho.

PREÂMBULO

Este documento de tese está apresentado no formato de manuscritos, contendo, além de uma breve introdução, de revisão de literatura e discussão, os seguintes anexos e item:

- (i) uma publicação de artigo como primeira autora (Anexo 3) com a descrição de uma recombinante emergente de norovírus GII.P16-GII.4 Sydney 2012 pela primeira vez no Brasil;
- (ii) uma publicação de artigo como coautora (Anexo 4) com a descrição de um surto de gastroenterite causado pelo norovírus recombinante GII.Pe-GII.4 Sydney 2012, ocorrido em unidade intensiva neonatal e pediátrica de um hospital da região metropolitana de Vitória, no mesmo ano de sua primeira descrição no mundo;
- (iii) um manuscrito a ser submetido para publicação com a descrição de variantes/recombinantes de norovírus detectados em três períodos de coleta de espécimes em nossa área geográfica (2003-2004, 2007-2011 e 2017-2018) (Anexo 5);
- (iv) Dados Complementares (Item 4), nos quais estão descritos resultados obtidos e ainda não registrados em manuscritos.

RESUMO

Norovírus humanos, pertencentes a três genogrupos e mais de 30 genótipos, são a principal causa de gastroenterite esporádica e de surtos no mundo. Eles são caracterizados por uma significativa evolução devida a eventos de mutações e recombinação, e geração de variantes de disseminação pandêmica. O objetivo deste estudo foi determinar a diversidade genética de norovírus em indivíduos com gastroenterite em nossa área geográfica. Três grupos de amostras fazem parte deste estudo: (i) espécimes fecais obtidos prospectivamente de crianças com diarreia (n=307) coletadas entre outubro de 2014 e setembro de 2018; (ii) espécimes positivos para norovírus (n=78) obtidos de crianças e adultos nos períodos de fevereiro de 2003 a junho de 2004 e dezembro de 2007 a junho de 2011; e (iii) espécimes positivos para norovírus (n=2) associado a um surto de gastroenterite em unidade hospitalar em 2012. A detecção dos norovírus foi realizada RT-qPCR para região de junção ORF1-ORF-2. Os genótipos foram determinados pela análise filogenética de sequências parciais da polimerase e do capsídeo. Sequenciamento completo da proteína do capsídeo (VP1) GII.4 Sydney 2012 e quase completa da polimerase GII.P16 da nova recombinante GII.4 Sydney [P16] foram obtidos e realizada a análise filogenética. Norovírus foram detectados em 24.4% (75/307) dos espécimes do estudo prospectivo e a análise filogenética (n=52) demonstrou o predomínio da recombinante GII.P16-GII.4 Sydney 2012 (n=27), descrita pela primeira vez no Brasil, seguida dos genótipos GII.4 Sydney 2012[P31] (n= 10) e GII.17[P17] (n=5), além de sete outros recombinantes em menor número de casos (GII.2[P16], GII.6[P7], GII.3[P16], GII.4 Sydney 2012[PNA], GII.1[Pg], GII.4 Sydney 2012[P4 New Orleans] e GI.7[P7]). Houve substituições de aminoácidos nas proteínas: (i) polimerase GII.P16 de cepas que circularam em 2016 e 2017 em comparação com sequências pré-2015 (disponíveis no GenBank); e em (ii) VP1 de cepas GII.4 Sydney 2012 associadas com GII.P16 (2016 e 2018) em comparação com aquelas associadas com GII.P31 antes de 2015. Foram detectadas diferentes variantes GII.4 em todos os períodos de coleta de amostras, coincidindo com a circulação no mundo. A recombinante GII.4 Sydney 2012[P31] foi a responsável pelo surto no hospital, ocorrido no mesmo ano de sua primeira descrição no mundo. Nosso estudo mostra a grande diversidade genética de norovírus

circulando em nossa área geográfica e destaca o relato inédito da recombinante emergente GII.4 Sydney 2012[P16] no Brasil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Breve Histórico.....	2
2.2 Estrutural viral.....	3
2.3 Classificação.....	6
2.4 Evolução.....	8
2.5 Patogênese.....	12
2.6 Epidemiologia e aspectos clínicos da infecção.....	14
2.7 Vacina.....	15
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos Específicos.....	17
4 DADOS COMPLEMENTARES	18
4.1 Caracterização das amostras do estudo prospectivo	18
Aspectos Éticos da Pesquisa	19
4.1.2 <i>Distribuição de amostras de fezes e casos de norovírus de acordo com idade das crianças infectadas, local e mês de coleta.</i>	19
Figura 6. Distribuição dos casos positivos de NoV de acordo com os meses de coleta.	20
4.1.3 <i>Principais manifestações clínicas</i>	21
4.1.4 <i>Distribuição dos genótipos de norovírus por mês de coleta</i>	21
4.1.5 <i>Quantificação de RNA viral nas fezes</i>	22
4.2 Análise molecular da polimerase quase completa e do capsídeo completo (VP1)	23
4.2.1 <i>Sequenciamento - Polimerase quase completa e VP1</i>	24
4.2.2 <i>Análise Filogenética</i>	25
4.2.3 <i>Análise da variação de aminoácidos</i>	28
4.2.3.1 Capsídeo (VP1 completa).....	28
4.2.3.2 Polimerase quase completa	29
5 DISCUSSÃO.....	30
6 CONCLUSÕES	36
7 REFERÊNCIAS	37
ANEXO 1	56

ANEXO 2	57
ANEXO 3	58
ANEXO 4	59
ANEXO 5	60

1 INTRODUÇÃO

Os norovírus são reconhecidos como a principal causa de gastroenterite em indivíduos de todas as idades, responsáveis por aproximadamente 20% dos casos de diarreia e 212.000 casos de morte no mundo, acometendo de forma mais grave crianças, idosos e pacientes imunodeprimidos (Ahmed *et al*, 2014; Pires *et al*, 2015; Nguyen *et al*, 2017).

Trata-se de vírus pequenos, não envelopados e altamente infecciosos (Teunis *et al*, 2008). O alto número de vírions nas fezes e no vômito, a alta estabilidade no ambiente, resistência à desinfecção e baixa dose infecciosa são fatores que contribuem para a alta infecciosidade e rápida transmissão do vírus. Soma-se a estas características o fato destes vírus possuírem RNA como genoma, caracterizado por uma rápida evolução por meio de mecanismos de mutação e recombinação (Donaldson *et al*, 2010). Estes mecanismos garantem a diversidade genética e a emergência de cepas variantes epidêmicas ou pandêmicas, com adaptação ao hospedeiro, escape da resposta imunitária, e consequente sobrevivência na população humana, além de impor um desafio ao desenvolvimento de vacinas eficazes (Bull *et al*, 2007).

Três dentre os dez genogrupos atualmente descritos para o gênero *Norovirus*, baseando-se na análise de sequência da principal proteína do capsídeo viral (VP1 – ORF2), infectam os seres humanos (GI, GII e GIV) (Kroneman *et al*, 2013, Chhabra *et al*, 2019). Os genótipos virais são, por sua vez, determinados baseando-se na sequência completa de VP1 e em sequência parcial da polimerase (ORF1), gerando uma classificação binária para estes vírus, primordial diante dos eventos frequentes de recombinação.

A admirável variedade de recombinantes que emergem rapidamente, frequentemente envolvidas em surtos, salienta a importância do monitoramento cuidadoso do surgimento de novas cepas, que poderia facilitar a detecção precoce daquelas com potencial pandêmico.

Estudos moleculares são, portanto, importantes para o entendimento do complexo processo de evolução destes vírus e para o rastreamento de disseminação de novas cepas com características epidêmicas ou pandêmicas. Por fim, a

caracterização molecular das cepas circulantes tem sua aplicabilidade importante para o desenvolvimento de vacinas e de antivirais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve Histórico

Durante décadas pesquisadores tentaram encontrar um agente etiológico para os surtos de gastroenterites agudas não bacterianas, que eram caracterizadas como doenças autolimitadas, com sintomas de diarreia, vômito e dor abdominal. A possível etiologia viral foi demonstrada entre 1945 e 1953 por meio da inoculação de filtrados livres de bactérias em voluntários, que apresentaram os sintomas descritos anteriormente (Reimann *et al*, 1945; Gordon *et al*, 1947; Jordan *et al*, 1953). No período de outubro a novembro de 1968 ocorreu um surto de gastroenterite numa escola na cidade de Norwalk, Ohio, Estados Unidos, em que metade dos alunos e professores desenvolveu gastroenterite e aproximadamente um terço dos familiares também adoeceram. As tentativas iniciais de identificar o agente causador foram fracassadas, porém amostras coletadas de pessoas doentes foram utilizadas como inóculos em estudos experimentais no *National Institute of Health* (Dolin *et al*, 1971). Finalmente, em 1972, Kapikian *et al*, por meio de microscopia eletrônica, identificaram partículas virais nas amostras de voluntários infectados com o inóculo de amostras do surto de Norwalk (Kapikian *et al*, 1972). O vírus foi chamado agente de Norwalk e se constituiu no primeiro agente infeccioso viral associado à gastroenterite.

Estudos posteriores demonstraram outros vírus morfológicamente similares, pequenos e arredondados também associados com gastroenterites (Appleton *et al*, 1977; Thornhill *et al*, 1977; Dolin *et al*, 1982), denominados então *small round structured viruses* (SRSVs). Sendo assim, a classificação desses vírus foi inicialmente baseada na morfologia ao microscópio eletrônico e o vírus Norwalk foi considerado a cepa protótipo dos SRSVs (Atmar & Estes, 2001).

Devido a características das partículas como densidade em gradiente de centrifugação, tamanho e estabilidade ao ácido e éter, o vírus Norwalk e os

outros SRSVs foram sugeridos ser classificados como “parvovirus-like” (Dolin *et al*, 1972). Entretanto, Greenberg *et al* (1981) propuseram a classificação do vírus Norwalk na família *Caliciviridae*, baseados na estrutura protéica do vírion. Posteriormente, a classificação do Norwalk como calicivírus foi reforçada por meio da clonagem do genoma, evidenciando seu genoma composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva (Jiang *et al*, 1990). Outros estudos confirmaram a relação genética entre Norwalk, os outros SRSVs e os calicivírus (Dingle *et al*, 1995; Lambden *et al*, 1995; Hardy & Estes, 1996; Seah *et al*, 1999).

Com o avanço na biologia molecular, foi possível a classificação de acordo com o genoma, permanecendo então na família *Caliciviridae* (Jiang *et al*, 1990).

2.2 Estrutural viral

Os norovírus são vírus redondos, pequenos (~38 nm), não envelopados e de simetria icosaédrica. O genoma é constituído de RNA de fita simples, polaridade positiva, de aproximadamente 7,6 Kb, poliadenilado na extremidade 3' e na extremidade 5' possui uma VPg (proteína viral associada ao genoma) ligada covalentemente (Figura 1). O RNA genômico é organizado em três regiões de leitura abertas (ORFs- *Open Reading Frames*): i) ORF1 codifica uma grande poliproteína não estrutural, que é clivada em várias proteínas não estruturais, essenciais para a replicação viral (NS1-NS7); ii) ORF2 codifica a proteína VP1 (~60KDa), a principal e maior do capsídeo e; iii) ORF3 codifica VP2, uma proteína pequena também constituinte do capsídeo viral, cujo tamanho varia entre os calicivírus (12 - 29 KDa) (Glass, 2000; Katayama, 2002; Chen *et al*, 2006).

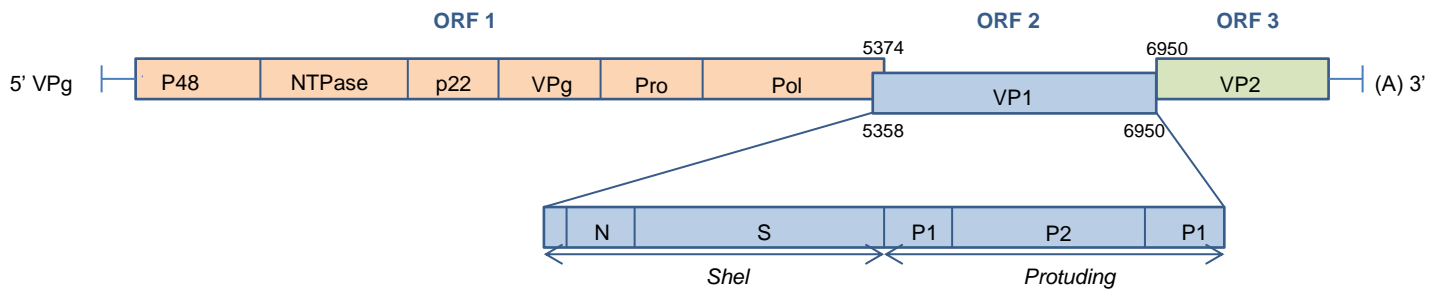


Figura 1. Representação esquemática do genoma dos norovírus. Proteínas não estruturais: P48 (NS1/2), NTPase (NS3), P22 (NS4), VPg (NS5), Pro (NS6) e Pol RNA (NS7). Proteínas estruturais: VP1 e VP2.

A poliproteína originada da ORF1 é clivada por uma proteinase 3C-*like* em pelo menos seis proteínas não estruturais (NS): P48 (NS1/2), NTPase (NS3), P22 (NS4), VPg (NS5), Pro (NS6) e Pol RNA (NS7) (Hardy *et al*, 2002; Belliot *et al*, 2003).

A RNA polimerase é uma enzima central na replicação do RNA, intimamente relacionado ao “*fitness*” viral, que é determinado por diversos fatores, como a eficiência da replicação viral e a diversidade genética (Bull *et al*, 2010).

A morfologia dos norovírus é estudada a partir de *virus-like particles* (VLPs) que são formadas pela expressão de proteínas do capsídeo (VP1) em baculovírus recombinantes e observadas por crio-microscopia eletrônica e por cristalografia de raio X (Figura 2) (Bertolotti-Ciarlet *et al*, 2002; Chen *et al*, 2006).

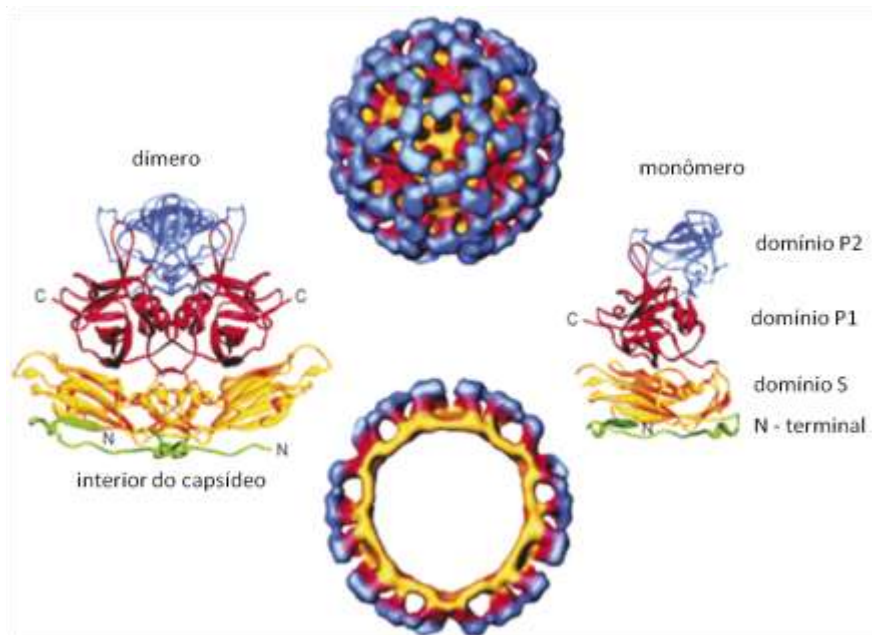


Figura 2. Estrutura da *virus-like particle* do vírus Norwalk. Adaptado: Hutson *et al*, 2004.

O vírion é composto por 90 dímeros da proteína VP1 (Figura 1), que é responsável pela maioria das funções relacionadas ao capsídeo, como montagem, interações com o hospedeiro e imunogenicidade. VP1 pode ser dividida em três domínios: N, S e P (Figura 2). O domínio N (N-terminal) é o mais interno; S (*Shell*) (resíduos 1-221) forma o núcleo estrutural, é o domínio intermediário e é responsável pela interação intermolecular do capsídeo viral e, sozinho, pode formar partículas icosaédricas lisas (Bertolotti-Ciarlet *et al*, 2003); o domínio P (*protuding*) é o domínio mais externo, apresentando uma protrusão em forma de arco emanando da superfície e está envolvido em interações diméricas para estabilizar o capsídeo (Bertolotti-Ciarlet *et al*, 2003). O domínio P é subdividido em dois subdomínios: P1 e P2 (Figuras 1 e 2) (Prasad *et al*, 1999). O subdomínio P1 é mais interno (forma a base dos arcos dos capsômeros), possui sequência razoavelmente conservada (Cao *et al*, 2007) e está implicado na antigenicidade do vírion (Hardy *et al*, 1996; Hale *et al*, 2000). O subdomínio P2 está localizado mais externamente (no topo dos arcos), apresentando alta variabilidade, sendo importante na resposta imunitária (Tan *et al*, 2003; Tan & Jiang, 2005; Cao *et al*, 2007).

No subdomínio P2 estão localizados os principais epítomos responsáveis pelo reconhecimento imunológico do hospedeiro e também os principais domínios de ligação aos diversos receptores HBGAs (*Histo-Blood Group Antigens*). Mutações no domínio P2 alteram a antigenicidade e a especificidade de reconhecimento pelos HBGAs, caracterizando uma nova cepa (Donaldson *et al*, 2008; Debbink *et al*, 2012; Carmona-Vicente *et al*, 2016).

A proteína VP2 parece ter um papel importante na produção de partículas infecciosas, fornecendo suporte estrutural para o capsídeo (Sosnovtsev *et al*, 2005; Vongpunsawad *et al*, 2013). Conley *et al* (2019) sugeriram que VP2 de calicivírus felino (FCV) forma uma espécie de portal que pode servir como um canal para liberação endossomal do genoma viral.

2.3 Classificação

De acordo com o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), os norovírus pertencem à família *Caliciviridae*, que é composta de uma ampla variedade de vírus (Vinjé *et al*, 2019). Vírus pertencentes aos gêneros *Lagovirus*, *Norovirus*, *Nebovirus*, *Recovirus*, *Sapovirus*, *Valovirus* e *Vesivirus* infectam mamíferos; vírus dos gêneros *Bavovirus* e *Nacovirus* infectam aves; enquanto que vírus dos gêneros *Minovirus* e *Salovirus* infectam peixes (Atmar & Estes, 2001; Farkas *et al*, 2008; L'Homme *et al*, 2009; Day *et al*, 2010; Wolf *et al*, 2011; Mikaelson *et al*, 2014; Mor *et al*, 2017). Somente os norovírus e os sapovírus infectam humanos e são importantes agentes causadores de gastroenterite aguda.

Os norovírus podem ser classificados em dez genogrupos (GI a GX), baseando-se na análise da sequência de VP1 (ORF2) (Kroneman *et al*, 2013, Chhabra *et al*, 2019). Os genogrupos GI, GII e GIV infectam humanos, sendo GI e GII os principais causadores de doença na população (Vinjé, 2015) (Figura 3). Os genogrupos, por sua vez, são subdivididos em diversos genótipos: 49 baseados na sequência completa de VP1 e 60 baseados em sequências parciais da polimerase (Figura 3) (Chhabra *et al*, 2019). GI e GII compartilham menos de 50% de identidade em VP1 e os genótipos apresentam menos de 20% de homologia (Vinjé *et al*, 2000; Zheng *et al*, 2006), destacando a grande

diversidade dos norovírus, devido à variação antigênica, que representa um importante obstáculo à imunidade protetora após infecção e vacinação (Mallory *et al*, 2019).

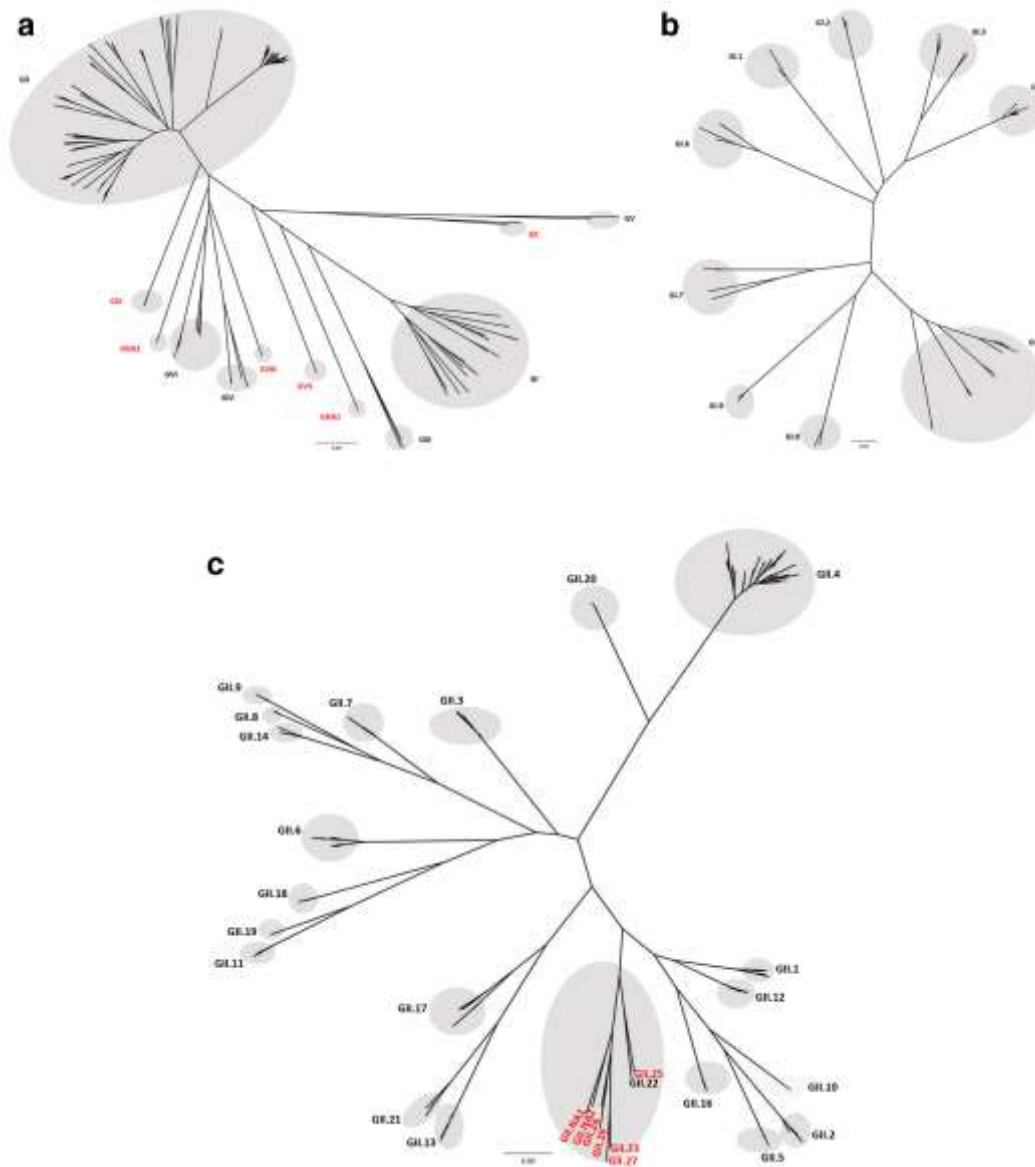


Figura 3. Classificação filogenética baseada nas sequências de VP1 (ORF2).
Fonte: Chhabra *et al*, 2019.

Os norovírus são classificados de acordo com o agrupamento filogenético de sequências completas dos aminoácidos de VP1, conforme proposto em 2013 por pesquisadores do NCWG (*Norovirus Classification Working Group*)

(Kroneman *et al*, 2013). No caso da subtipagem em variantes GII.4, foi decidido que seria baseada no agrupamento filogenético e que novas variantes somente seriam reconhecidas depois de se tornarem epidêmicas em pelo menos duas regiões geograficamente diferentes. Além disso, Kroneman *et al* (2013) propuseram uma nomenclatura padrão universal. A letra “P” passou a ser utilizada para especificar a região da polimerase. Por exemplo, se uma cepa é classificada pela sequência da polimerase como GII.7 e pelo capsídeo como GII.6, sua nomenclatura ficaria GII.P7-GII.6. Quando a sequência ORF-1 não possuía a ORF-2 correspondente conhecida, ela passou a ser chamada de “órfã”, pois poderia associar-se “promiscuamente” com diferentes capsídeos. Genótipos ORF1 órfãos passaram a ser representados preliminarmente por letra minúscula ao invés de números, até a identificação do capsídeo correspondente (Bull *et al*, 2007; Kroneman *et al*, 2013), como é o caso de GII.b, que inicialmente foi considerado um recombinante obrigatório (Bruggink *et al*, 2009; Bruggink *et al*, 2013) e posteriormente foi renomeado como GII.P21 (Kroneman *et al*, 2013).

Recentemente, Chhabra *et al* (2019) atualizaram a classificação dos norovírus, acrescentando novos genogrupos e genótipos baseados nas sequências completas de aminoácidos do capsídeo de acordo com critérios outrora estabelecidos por Kroneman *et al* (2013). Além disso, classificaram sequências de nucleotídeos da região parcial da polimerase em tipos de P, independentemente da classificação do capsídeo (VP1) correspondente eliminando, dessa forma, a designação órfã de ORF1 (por exemplo, a polimerase órfã GII.Pe passou a ser classificada como GII.P31). A nova nomenclatura passa a designar primeiro o nome do capsídeo seguido pelo tipo P, por exemplo, de GII.P16-GII.4 Sydney [P16] para GII.4 Sydney [P16], ou GII.P7-GII.4 para GII.6 [P7].

2.4 Evolução

Os norovírus são considerados vírus de evolução rápida (de Graaf *et al*, 2016; Parra *et al*, 2017). Dois mecanismos importantes contribuem para a evolução dos norovírus, implicando em sua extensa variabilidade antigênica: as mutações pontuais e a recombinação (White, 2014).

As mutações pontuais constituem um mecanismo importante para a diversidade genética dos norovírus, especialmente no caso de GII.4. Conforme previamente mencionamos, os aminoácidos associados à variação antigênica estão localizados no domínio P da proteína VP1 do capsídeo, que é responsável pela ligação aos receptores HBGAs e aos anticorpos (Debbink *et al*, 2013). Lindesmith *et al* (2012) propuseram cinco epítomos hipervariáveis (A a E) para NoV GII.4 em VP1.

A recombinação, por sua vez, é gerada quando duas cepas distintas infectam uma mesma célula havendo, durante a replicação, junção de duas regiões diferentes do genoma de ambas, normalmente entre a ORF1 (capsídeo) e ORF2 (polimerase) (Figura 4). Este fenômeno pode ocorrer entre genótipos diferentes (intergenotípica) ou entre cepas de um mesmo genótipo (intra-genotípica) (Bull *et al*, 2005). Apesar de a junção entre a ORF1 e ORF2 ser o sítio mais comum de recombinação, também há relatos de o evento ocorrer em sítios menos comuns, como entre ORF2 e ORF3 (Eden *et al*, 2013) e também na região da polimerase (Siqueira *et al*, 2016).

A recombinação entre as ORF 1 e 2 proporciona troca entre fragmentos do genoma que codifica proteínas estruturais e não estruturais, possibilitando aos novos vírus a obtenção de uma polimerase mais eficiente, aumentando a capacidade adaptativa e a virulência (Bull *et al*, 2007; Rocha Pereira *et al*, 2016).

Ludwig-Begall *et al* (2019) compararam a dinâmica da recombinação dos norovírus ao cubo de Rubik (conhecido como cubo mágico), em que cada quadrado pode ser articulado para formar parceria com qualquer um dos outros quadrados, podendo gerar inúmeras combinações.

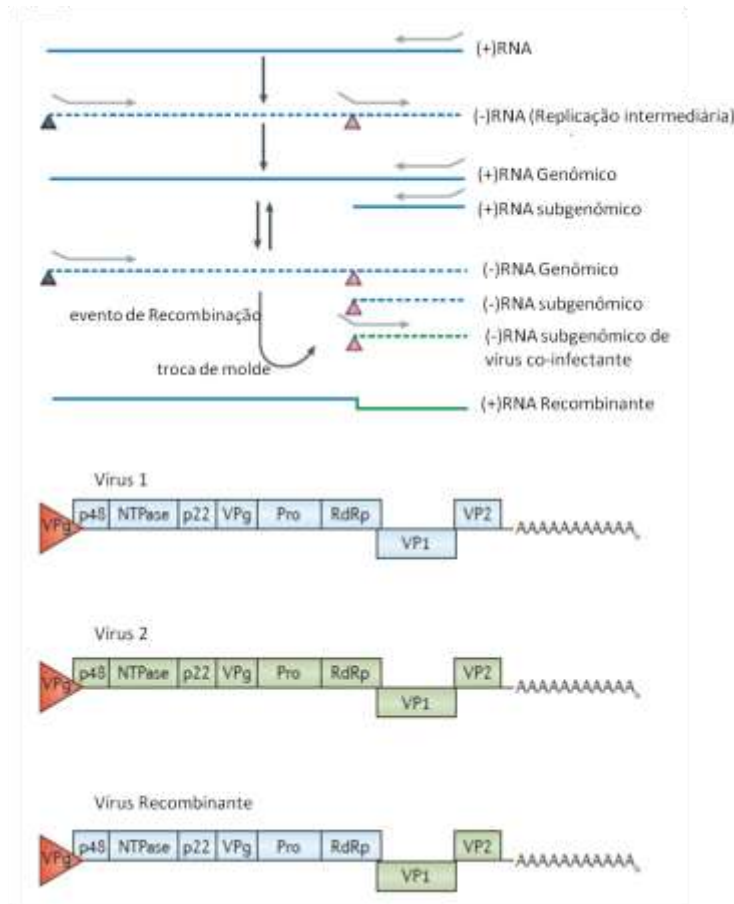


Figura 4. Mecanismo de recombinação de norovírus (Adaptado de Graaf *et al*, 2016).

Apesar dos norovírus GI, GII e GIV estarem associados à infecção em humanos, GII são os responsáveis pela maioria das infecções, impulsionados pela variabilidade de cepas dentro do genótipo GII.4. Estudos demonstram que o genótipo GII.4, o mais prevalente no mundo, está evoluindo de modo similar aos vírus influenza H3N2, com substituição temporal de variantes predominantes guiada pela resposta imunitária do indivíduo (Lindesmith *et al*, 2008; Victoria *et al*, 2009; Debbink *et al*, 2013; Thoma *et al*, 2019). Embora tenha havido um aumento da circulação de GII.17 e GII.2 nos últimos anos (GII.17 entre 2014/2015 e GII.2 entre 2016/2017) (Matsushima *et al*, 2015; Ao *et al*, 2017), o genótipo GII.4 persiste na população, sendo responsável por 60 a 80% de todas as infecções causadas pelos norovírus, e por 50-70% dos surtos de norovírus por ano (Siebenga *et al*, 2009; Tohma *et al*, 2019). Desde a década de 90,

aproximadamente a cada dois ou três anos, mais de dez variantes GII.4 têm sido relatadas, sendo que sete delas apresentaram caráter pandêmico: US95_96, Farmington Hills, Hunter, Yerseke, Den Haag, New Orleans e Sydney (Figura 5). As cinco primeiras são resultado de mutações no domínio P do capsídeo e as duas últimas (New Orleans e Sydney), de recombinação entre ORF1 e ORF2 (Eden *et al*, 2013; White *et al*, 2014; Carmona-Vicente *et al*, 2016).

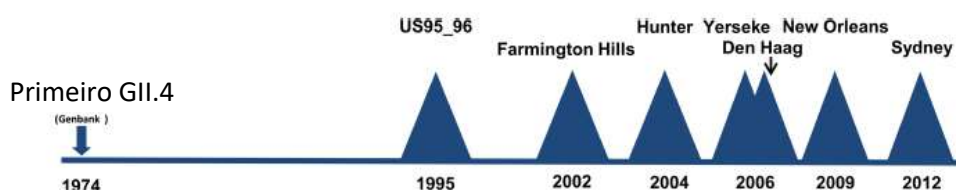


Figura 5. Variantes pandêmicas do genótipo GII.4 (Fonte: Vinjé, 2015).

Acredita-se também que, assim como acontece com cepas GII.4, o genótipo GII.17 também tenha variantes, pelo fato de haver trocas de aminoácidos nos principais epítomos do capsídeo (Debbink *et al*, 2012). No inverno de 2014-2015, houve um súbito aumento na detecção do genótipo GII.17 em alguns países da Ásia e suspeitou-se que ele substituiria a variante Sydney 2012 (de Graaf *et al*, 2015; Matsushima *et al*, 2015). Posteriormente, durante o inverno de 2016-2017 do hemisfério norte, houve a reemergência da recombinante GII.2[P16] em países como Alemanha, China, Taiwan, Hong Kong e Japão, levando a rápido aumento de surtos de gastroenterite por norovírus, substituindo os genótipos GII.4 e GII.17 (Ao *et al*, 2017; Bidalot *et al*, 2017; Chan *et al*, 2017; Niendorf *et al*, 2017).

Em 2016, uma nova recombinante emergiu, constituída de capsídeo similar ao GII.4 Sydney 2012, porém com a polimerase GII.P16 pouco comum. GII.4 Sydney[P16] foi descrita pela primeira vez na cidade de Kawasaki, no Japão (Matsushima *et al*, 2016), sendo depois detectada em diversos países como Coréia do Sul, Alemanha, Japão, Estados Unidos e Austrália (<https://www.cdc.gov/norovirus/reporting/calicinet/data.html>; Bidalot *et al*, 2017; Choi *et al*, 2017; Lun *et al*, 2018).

Considerando a rápida evolução dos norovírus, alavancada especialmente pela frequente recombinação e também pelas mutações, favorecendo sua grande diversidade genética, Thoma *et al* (2019) destacam a importância da identificação precoce de alterações necessárias para o surgimento de uma nova variante, espécie de “Santo Graal”, para controlar vírus que mudam constantemente.

2.5 Patogênese

Apesar da importância dos norovírus no cenário da gastroenterite no mundo, ainda há muitos aspectos sobre a patogênese a serem esclarecidos, devido à falta de um sistema de cultura de células eficiente e facilmente disponível. Há dois sistemas descritos, linhagem de células B e enteróides derivados de células-tronco, porém replicam norovírus humanos em níveis suficientes (Jones *et al*, 2014; Ettayeb *et al*, 2016). Recentemente foi descrita replicação eficiente de vários genótipos de norovírus humanos em larva de peixe-zebra (*Danio rerio*) (Van Dycke *et al*, 2019), que provavelmente facilitará o estudo da patogênese dos norovírus.

A interação entre os norovírus com seus hospedeiros é confusa, uma vez que nem todos os indivíduos são susceptíveis à infecção e nem todos os genótipos são patogênicos da mesma forma. Estudos em voluntários e em animais mostram que há fatores importantes relacionados à patogênese dos norovírus, como a ligação aos HBGAs e a resposta imunitária à infecção (Lindesmith *et al*, 2003; Friesema *et al*, 2009).

Os HBGAs humanos são carboidratos complexos presentes na superfície das membranas plasmáticas de células de vários tecidos humanos (Le Pendu *et al*, 2004; Nordgren *et al*, 2019) e também podem ser encontradas como oligossacarídeos livres em líquidos biológicos como leite, saliva, sangue e conteúdos intestinais (Tan & Jiang, 2005). Os HBGAs são extremamente polimórficos e três principais famílias - Lewis, secretor e ABH - são relacionadas no reconhecimento pelos norovírus (Huang *et al*, 2003). A síntese dos HBGAs ocorre por meio da ação de enzimas fucosiltransferases, codificadas pelos genes *ABH*, *FUT2* e *FUT3*, e diferenças na expressão dos HBGAs interferem na

susceptibilidade dos indivíduos à infecção pelos norovírus (Marionneau *et al*, 2002). As famílias dos genes ABH, Lewis e secretor contém alelos silenciosos, podendo levar a fenótipos nulos nos *loci* como mutações inativadoras em FUT2 que são responsáveis pelo fenótipo não-secretor, encontrado em aproximadamente 20% das populações Norte-americana e Européia (Marionneau *et al*, 2002). Indivíduos não secretores são caracterizados pela ausência de antígenos ABH na saliva e na maioria das células epiteliais dos tratos digestivo, genitourinário e respiratório (Marionneau *et al*, 2002), conferindo na maioria das vezes aparente proteção contra infecção por determinados genótipos dos norovírus, como GII.4 (French *et al*, 2012). De fato, em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, observamos infecção preferencial por norovírus em indivíduos secretores (Vicentini *et al*, 2013).

A proteína do capsídeo VP1 de diferentes genótipos dos norovírus apresenta distintas especificidades de ligação a diversos HBGAs, o que leva a diferenças de susceptibilidade dos indivíduos a cepas específicas de norovírus (Lindesmith *et al*, 2003). Por exemplo, indivíduos não secretores são aparentemente resistentes à infecção por genótipos como GII.4, GII.3, GI.1 (French *et al*, 2012; Liu *et al*, 2015), e podem ser susceptíveis à outras cepas, como GI.3, que, em estudo realizado na Suécia, não mostrou associação entre *status* secretor e susceptibilidade à infecção (Nordgren *et al*, 2010). Por conseguinte, alterações (mutações) nos epítomos localizados na proteína VP1, podem levar a modificações tanto na capacidade de ligação dos vírus quanto no reconhecimento pelo sistema imunitário.

A imunidade ao norovírus é complexa. A suscetibilidade natural ao norovírus pode variar entre indivíduos e genótipos e a duração e o grau de proteção cruzada da imunidade adquirida não são bem compreendidos (Mattison *et al*, 2018). A maioria das informações está baseada em estudos com voluntários e em indivíduos envolvidos em surtos de gastroenterites, sugerindo-se repostas imunitárias homólogas após infecção por norovírus em voluntários, entretanto a proteção foi relatada ser curta (semanas a meses) e cepa específica (Parrino *et al*, 1977; Farkas *et al*, 2003). Estudos mais recentes estimam duração de imunidade de 4 a 8 anos após a infecção (Simmons *et al*, 2013). Além disso, não há correlação entre presença de anticorpos e proteção contra infecção, o

que explica a grande difusão de infecções por norovírus a cada ano e os múltiplos episódios em um mesmo indivíduo, inclusive na população adulta (Rockx *et al*, 2005).

2.6 Epidemiologia e aspectos clínicos da infecção

Os norovírus infectam pessoas de todas as idades e são causa de gastroenterite em diversos ambientes como escolas, hospitais, casas de repouso, creches e quartéis militares (Westrell *et al*, 2010; Bányai *et al*, 2018; Volpini *et al*, 2019). Eles são considerados a principal causa de surtos e casos esporádicos de gastroenterite no mundo (Ahmed *et al*, 2014). Estima-se que os norovírus causem 64.000 episódios de diarreia que necessitam de hospitalização, 900.000 episódios que levam a visitas a médicos de crianças de países industrializados e são responsáveis por 212.000 mortes por ano no mundo (Patel *et al*, 2008; Pires *et al*, 2015).

O grupo referência em epidemiologia sobre doenças transmitidas por alimentos (*Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group - FERG*) da OMS estima que os norovírus causaram 684 milhões de casos de gastroenterites no ano de 2010 e foram a principal causa no mundo de doença transmitida por alimentos (Kirk *et al*, 2015).

Os norovírus são transmitidos pela via fecal-oral, por contato entre indivíduos e através da ingestão de alimentos e de água contaminados (Atmar & Estes, 2006). Também há evidências de transmissão pelo ar através de aerossóis produzidos pelo ato de vomitar, forma de transmissão muito comum em hospitais, asilos e navios de cruzeiros (Marks *et al*, 2000; Marks *et al*, 2003). A dose infecciosa é baixa, representada por menos de 10 a 100 vírions, conforme dados de estudos experimentais em humanos (Hutson *et al*, 2004).

São vírions resistentes à inativação/desinfecção por desinfetantes normalmente utilizados, como alcoóis e compostos quaternários de amônio, que geralmente são eficazes contra outros vírions e a maioria das bactérias (Kingsley *et al*, 2014). São classificados como agentes biológicos de classe B por causa da alta estabilidade no ambiente, pela alta infecciosidade, pelo súbito e explosivo

estabelecimento dos surtos e pela natureza debilitante da doença (Hutson *et al*, 2004).

A média do período de incubação é de 12-48 h e a média de duração dos sintomas, de 12-72 horas (Graham *et al*, 1994). Os sintomas apresentados são vômito, diarreia, dor abdominal, febre, cefaleia, mialgia e calafrios. As fezes apresentam-se aquosas, com presença de muco. Pode haver complicações como desidratação, desequilíbrio hidroeletrolítico, insuficiência renal, desnutrição e, em crianças jovens, convulsões benignas (Higuchi *et al*, 2017; Kim *et al*, 2018). Recentemente foi relatado o primeiro caso de síndrome hemolítica urêmica em um bebê após infecção por norovírus (Daher *et al*, 2019). Estudos demonstram um longo tempo de excreção viral, mesmo após a resolução dos sintomas. Há relato de início de excreção viral de 18 horas após inoculação em voluntários e tempo de excreção viral variando de 13 a 56 dias (Okhuysen *et al*, 1995; Rockx *et al*, 2002; Atmar *et al*, 2008).

A doença resultante da infecção pelos norovírus foi historicamente descrita como moderada e auto-limitada, com base em estudos de surtos e também em estudos envolvendo voluntários, contudo, os sintomas podem durar mais tempo numa parcela de população, como em crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (Rockx *et al*, 2002) e conforme evidenciamos em crianças hospitalizadas em hospital em nossa área geográfica (Ribeiro *et al*, 2008). No caso de pacientes imunocomprometidos, que podem desenvolver infecção crônica com duração de meses ou até de anos, especula-se que podem funcionar como reservatórios dos vírus, devido à reduzida pressão imunitária (Karst *et al*, 2014; Vega *et al*, 2014).

Além disso, há evidências de consequências desenvolvidas após infecção por norovírus, como Síndrome do Intestino Irritável e Doença Inflamatória Intestinal, em que os norovírus parecem servir como um “gatilho” dependendo do contexto genético (Marshall *et al*, 2007; Cadwell, *et al*, 2010).

2.7 Vacina

O desenvolvimento de vacina para os norovírus é dificultado pela grande diversidade genética, pela ausência de um modelo animal e de um sistema

eficiente de cultivo. Apesar disso há várias sendo desenvolvidas utilizando diferentes tecnologias, tanto monovalentes de GI.1 quanto bivalentes, baseadas em GI.1 e GII.4, incluindo duas em fase clínica (Debbink *et al*, 2014; Baehner *et al*, 2016).

. Essas tecnologias incluem VLPs, partículas P e adenovírus recombinantes, que expressam a proteína VP1. Tecnologias envolvendo vírus “mortos” ou atenuados, não foram adotadas devido à falta de um sistema de cultura. A recente descrição de um sistema modelo *in vivo* para estudar a replicação dos norovírus humanos utilizando larvas de peixe-zebra (Van Dycke *et al*, 2019) poderá abrir novos caminhos para a pesquisa dos norovírus. As duas vacinas em ensaios clínicos em humanos incluem uma vacina VLP bivalente GI.1 / GII.4 intramuscular nos ensaios de Fase IIb (Takeda *et al*, 2016) e uma vacina monovalente via oral (comprimido) de adenovírus recombinante que expressa a proteína VP1 GI.1 na Fase I (Tucker *et al*, 2008). Devido à grande capacidade de evolução dos norovírus, vacinas desenvolvidas provavelmente deverão ser reformuladas a cada determinado período de tempo, semelhante ao que ocorre com as vacinas para o vírus influenza (Graaf *et al*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a diversidade genética de norovírus em indivíduos com gastroenterite e comparar com genótipos circulantes previamente em uma mesma área geográfica.

3.2 Objetivos Específicos

- Detectar os norovírus em crianças com gastroenterite e descrever sinais e sintomas clínicos das crianças infectadas;
- Caracterizar os genótipos e descrever as variantes e recombinantes de norovírus;
- Determinar carga viral fecal de cepas recombinantes;
- Descrever a variabilidade molecular em sequências da polimerase e do capsídeo de recombinantes emergentes;
- Descrever os genótipos de norovírus que circularam em diferentes períodos de tempo em indivíduos infectados, de casos esporádicos e de surto em hospital;

4 DADOS COMPLEMENTARES

Para melhor compreensão, os resultados referentes aos três primeiros dos cinco objetivos específicos estão descritos no manuscrito publicado intitulado “*Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in Southeastern Brazil in 2016*” (Anexo 3). Resultados referentes ao quinto objetivo específico estão apresentados como forma de manuscrito publicado intitulado “*An outbreak due to a norovirus GII.Pe-GII.4 Sydney 2012 recombinant in neonatal and pediatric intensive care units*” (Anexo 4) ou escrito para ser submetido à publicação e intitulado “*Genetic diversity of noroviruses in different periods of time in all age individuals, Southeastern Brazil.*” (Anexo 5).

Apresentamos a seguir resultados do estudo desenvolvido que não fazem parte de manuscrito publicado ou escrito.

4.1 Caracterização das amostras do estudo prospectivo

Foram obtidas 307 amostras fecais por eliminação espontânea de crianças de ambos os sexos, com até 11 anos de idade (mediana= 16 meses) com sintomas de gastroenterite aguda atendidas predominantemente (91,1% das amostras) no pronto socorro do Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora Glória (HINSG) e no Pronto Atendimento (PA) de São Pedro (n=275), e em outras localidades (8,9%) [PA da Praia do Suá, no Pronto Socorro do Vitória Apart Hospital e internadas no Hospital Universitário Cassiano Moraes (HUCAM)]. Também foram utilizadas amostras cedidas pelo Laboratório Central da Secretaria Estadual de Saúde (LACEN - ES) (Tabela 1). A coleta foi realizada em outubro de 2014 a julho de 2016 e setembro de 2017 a setembro de 2018.

Locais de coleta	N
HINSG	153
PA São Pedro	122
PA Praia Suá	7
Vitória Apart Hospital	2
HUCAM	2
LACEN-ES	21
Total	307

Tabela 1. Distribuição do número de amostras fecais obtidas de crianças com diarreia de acordo com o local de coleta.

As amostras fecais foram coletadas após obtenção de consentimento livre e esclarecido por parte do responsável e assinatura do Termo de Consentimento (TCLE). Foi aplicado questionário com o responsável pela criança para obtenção de informações referentes aos pacientes como idade, sexo, residência e sintomas (Anexo 1). O TCLE não foi utilizado em relação às amostras obtidas via LACEN, por fazerem parte de uma estratégia de vigilância em DDA (Doença Diarreica Aguda).

Aspectos Éticos da Pesquisa

Este projeto obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, parecer número 1.302.166 (Anexo 2).

4.1.2 Distribuição de amostras de fezes e casos de norovírus de acordo com idade das crianças infectadas, local e mês de coleta.

A distribuição dos casos positivos para norovírus conforme a idade das crianças pode ser observada na Tabela 2; 31,5% (64/203) das crianças até os 24 meses de vida e 10,6% após os 24 meses tiveram a infecção pelo norovírus. A distribuição de casos positivos para norovírus em relação ao local de coleta e número de amostras coletadas pode ser observado na Tabela 3.

Idade (meses)	Total de amostras	Norovírus + n (%)
0 a 6	50	8 (16)
7 a 12	68	34 (50)
13 a 18	56	14 (25)
19 a 24	29	8 (27,5)
> 24	104	11 (10)
Total	307	75 (24,4)

Tabela 2. Idade estratificada para crianças positivas para norovírus.

Locais de coleta	Quantidade de amostras coletadas	Norovírus n (%)
HINSG	153	36 (23,5)
PA São Pedro	122	26 (21,3)
PA Praia Suá	7	0
Vitória Apart Hospital	2	1
LACEN-ES	21	10 (47,6)
HUCAM	2	2

Tabela 3. Total de amostras e frequência de norovírus por local de coleta.

Os casos positivos para norovírus foram detectados durante todo o período de coleta, sendo mais frequentes entre os meses de março a junho do ano de 2015, fevereiro a junho de 2016 e março a julho de 2018, coincidindo com a maior frequência de coleta das fezes (Figura 1).

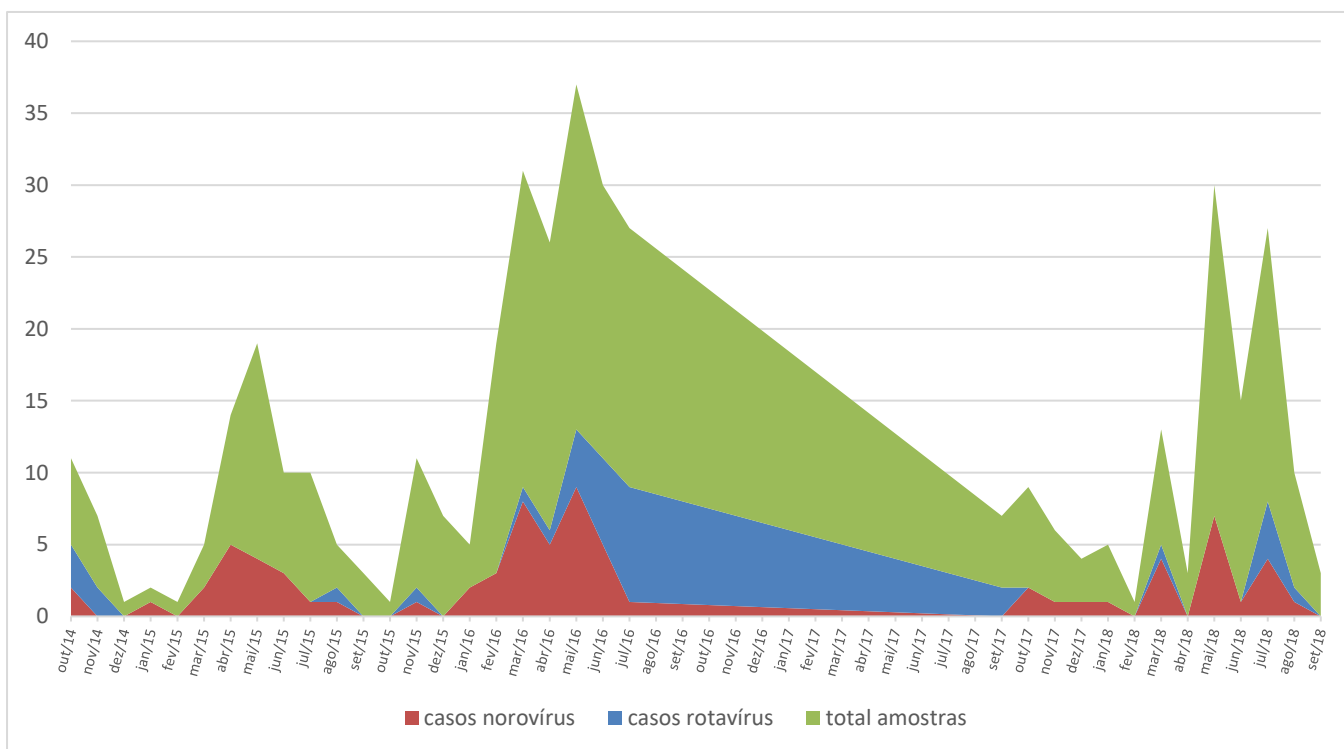


Figura 6. Distribuição dos casos positivos de NoV de acordo com os meses de coleta.

4.1.3 Principais manifestações clínicas

Manifestações clínicas	Presença		
	Sim	Não	Sem informação
	n (%)	n (%)	n (%)
Diarreia	66 (88)	1 (0,1)	8 (10,6)
Vômito	57 (76)	10 (13,3)	8 (10,6)
Febre	35 (46,6)	31 (41,3)	9 (12)
Sintomas respiratórios	49 (65,3)	14 (18,6)	12 (16)
Dor abdominal	27 (36)	37 (49,3)	11 (14,6)

Tabela 4. Principais manifestações clínicas nas 75 crianças positivas para norovírus.

4.1.4 Distribuição dos genótipos de norovírus por mês de coleta

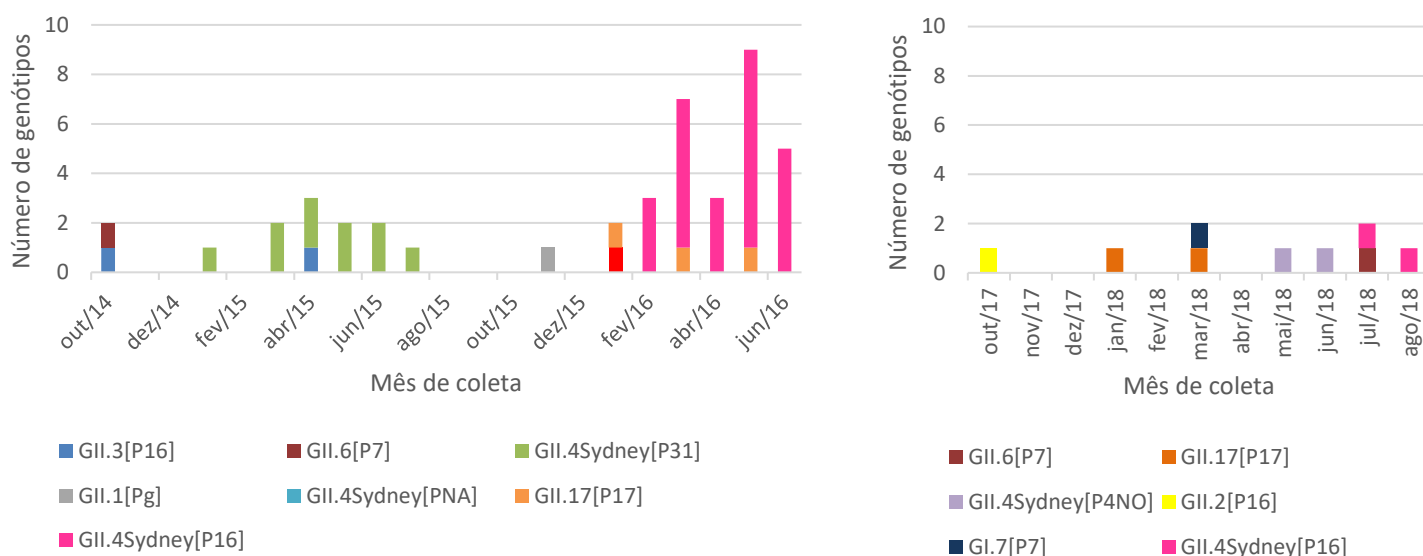


Figura 7. Distribuição dos genótipos de norovírus de acordo com os meses de coleta.

4.1.5 Quantificação de RNA viral nas fezes

Foi realizada a quantificação de RNA viral em 50 amostras de fezes positivas para norovírus. A quantidade de RNA viral nas fezes variou de $20,93 \times 10^6$ a $92,28 \times 10^{10}$ cópias de RNA por gramas de fezes (Tabela 5 e Figura 8).

Genótipos	n	Variação carga viral (log ₁₀ / g de fezes)
GII.4Sydney[P31]	10	9,74 - 11,96 (mediana=10,46)
GII.4Sydney[P16]	22	7,32 - 11,58 (mediana=9,46)
GII.17[P17]	3	8,17 - 10,04
GII.3[P16]	2	11,17 e 11,44
GII.6[P7]	1	10,82
GII.1[Pg]	1	10,02
GII.4Sydney[PNA]	1	11,45
GII.NA	10	7,82 - 10,08 (mediana=9)

Tabela 5. Faixas de quantificação viral em logaritmo / g fezes.

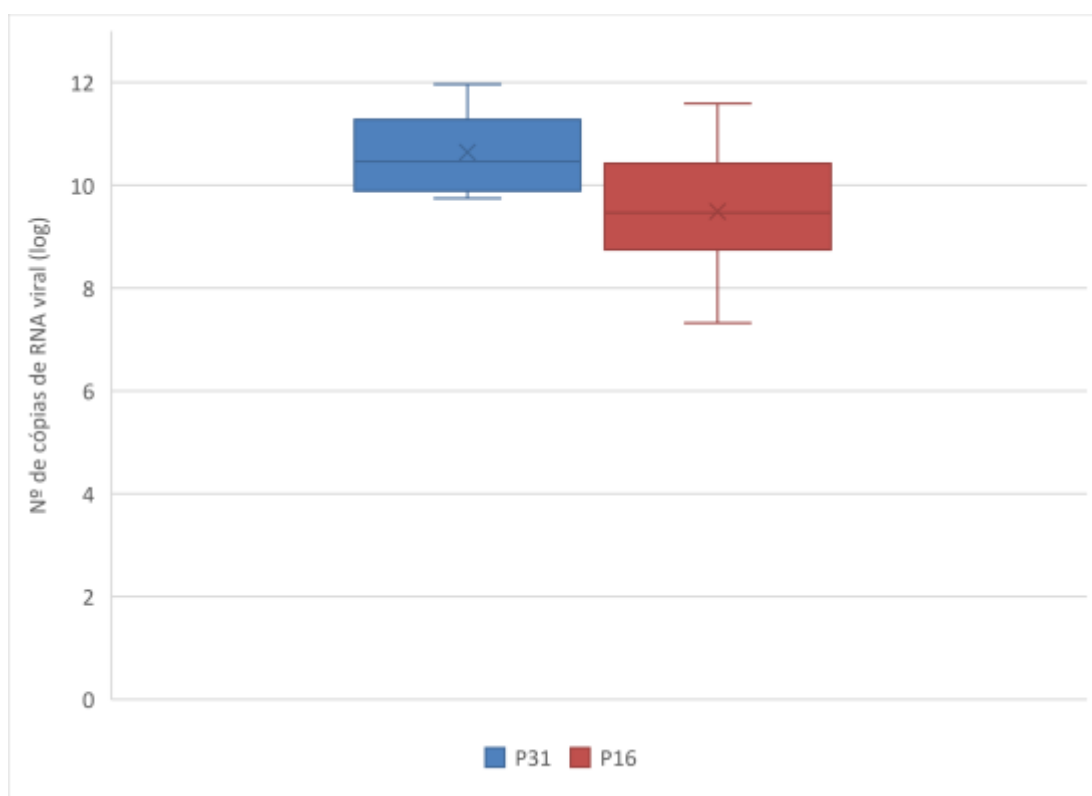


Figura 8. Quantidade de cópias de RNA viral nas amostras fecais dos genótipos GII.4 Sydney [P31] e GII.4 Sydney [P16].

4.2 Análise molecular da polimerase quase completa e do capsídeo completo (VP1)

Com o objetivo de analisar se havia modificação em sequência de nucleotídeos na polimerase GII.P16 que emergiu em 2016 associada aos capsídeos GII.4 Sydney 2012 e GII.2 em relação às previamente circulantes no mundo, elas foram submetidas ao sequenciamento da região quase completa de três amostras selecionadas, sendo duas GII.P16 recombinadas com capsídeo GII.4 Sydney 2012 (detectadas em 2016) e uma com capsídeo GII.2 (detectada em 2017) (Tabela 6).

A fim de verificar se ocorreram variações em sequência de nucleotídeos em gene da proteína VP1 na variante GII.4 Sydney 2012, detectados em diferentes períodos de tempo em nossa área geográfica, os capsídeos completos foram comparados com sequências do GenBank, especialmente na região do domínio P2. Selecionamos para este estudo, cinco amostras que tiveram a ORF-2 (VP1) completa sequenciada, detectadas nos anos de 2015, 2016 e 2018 associadas aos capsídeos GII.P31, GII.P16 e GII.P4 New Orleans (Tabela 7).

Ano	Polimerase P16 recombinante	N ° de amostras
2016	GII.4 Sydney[P16]	2
2017	GII.2[P16]	1

Tabela .6 Amostras selecionadas para análise de polimerase quase completa.

Ano	VP1 (ORF-2) recombinante	N ° de amostras
2015	GII.4 Sydney 2012[P31]	1
2016	GII.4 Sydney[P16]	2
2018	GII.4 Sydney[P16]	1
2018	GII.4 Sydney[P4 New Orleans]	1

Tabela 7. Amostras selecionadas para análise de ORF2 completo.

4.2.1 Sequenciamento - Polimerase quase completa e VP1

Para o sequenciamento da polimerase quase completa foram amplificados dois fragmentos utilizando dois pares de iniciadores: NV6F/NV6R e NV4611/G2SKR (Tabela 8).

Para sequenciar o capsídeo completo foram amplificados três fragmentos utilizando três pares de iniciadores: ORF2-F1/ORF2-R1, EVP2F/EVP2R, ORF2-F2/ORF2-R2 (Tabela8).

Em todas as PCRs o cDNA (5 µL) foi adicionado a um volume final de reação de PCR de 25 µl contendo 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (Invitrogen), 160 nM de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen®) e tampão de reação (20 mM de tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl). A amplificação foi realizada com desnaturação 95°C/15 minutos, seguido de quarenta ciclos 95°C/1min, 50°C/1min e 72°C/1min, com extensão final a 72°C por 10min.

Os amplicons de 865 pb e 1051 pb (polimerase quase completa) e 943 pb, 672 pb e 945 pb (VP1 completa) obtidos nas PCRs foram purificados utilizando a enzima ExoProStar™ (GE Healthcare). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando um ABI Prism 310 Genetic Analyzer e Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems) utilizando os iniciadores *forward* (NV6F ou NV4611) e *reverse* (NV6R ou G2SKR) utilizados

nas reações de amplificação. A purificação dos produtos de reação do sequenciamento foi realizada por precipitação com etanol e EDTA.

Região	Iniciador	Sequence 5' – 3'	Sense	Localizações	Referência
Polimerase quase completa	NV6F	AGCACCAAGACGAAATTCTGGAG	+	3638–3660 ^a	Chhabra <i>et al</i> , 2010
	NV6R	ATGGAGTTCCATTGGGAGGTGCA	-	4481–4503 ^a	Chhabra <i>et al</i> , 2010
	NV4611	CWGCAGCMCTDGAATCATGG	+	4338–4358 ^a	Yuen <i>et al</i> , 2001
	G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTTRTACAT	-	5367-5389 ^a	Kojima <i>et al</i> , 2002
Capsídeo (VP1 completa)	ORF2-F1	AAGAGCCAATGTTCAGATGG ^a	+	5054-5023 ^b	Kim <i>et al</i> , 2014
	ORF2-R1	CTCTGAAGGTGCAGATGTT ^a	-	5928-5946 ^b	Kim <i>et al</i> , 2014
	EVP2F	GTR CCR CCH ACA GTT GAR TCA	+	5730-5750	Vega <i>et al</i> , 2011
	EVP2R	CCG GGC ATA GTR GAY CTR AAG AA	-	6381-6402	Vega <i>et al</i> , 2011
	ORF2-F2	AACATCTGCACCTTCAGAG ^a	+	5928-5946 ^b	Kim <i>et al</i> , 2014
	ORF2-R2	GAAGCCTGTTGTAGATTGCT ^a	-	6854-6873 ^b	Kim <i>et al</i> , 2014

Tabela 8. Lista dos iniciadores utilizados na análise.

^a Genomic locations of the Lordsdale Virus genome (X86557)

^b Genomic locations of the Farmington Hills (AY502023)

4.2.2 Análise Filogenética

As sequências de nucleotídeos obtidas no estudo foram editadas utilizando o BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Posteriormente, a sequências de 1.622 nt (VP1 completa) e de 1464 nt (polimerase quase completa) foram alinhadas utilizando o programa SeaView v.4.5.4 (Gouy *et al*, 2010). As sequências foram, então, comparadas com sequências disponíveis no

GenBank, assim como sequências referências de cada genótipo. As árvores filogenéticas das sequências da polimerase quase completa e do capsídeo completo (VP1) foram construídas utilizando o programa MEGA versão 3.1 (Kumar *et al*, 2004) pelo método *maximum likelihood*, com a distância genética calculada pelo modelo Kimura parâmetro utilizando 2000 pseudo-réplicas (Figuras 9 e 10).

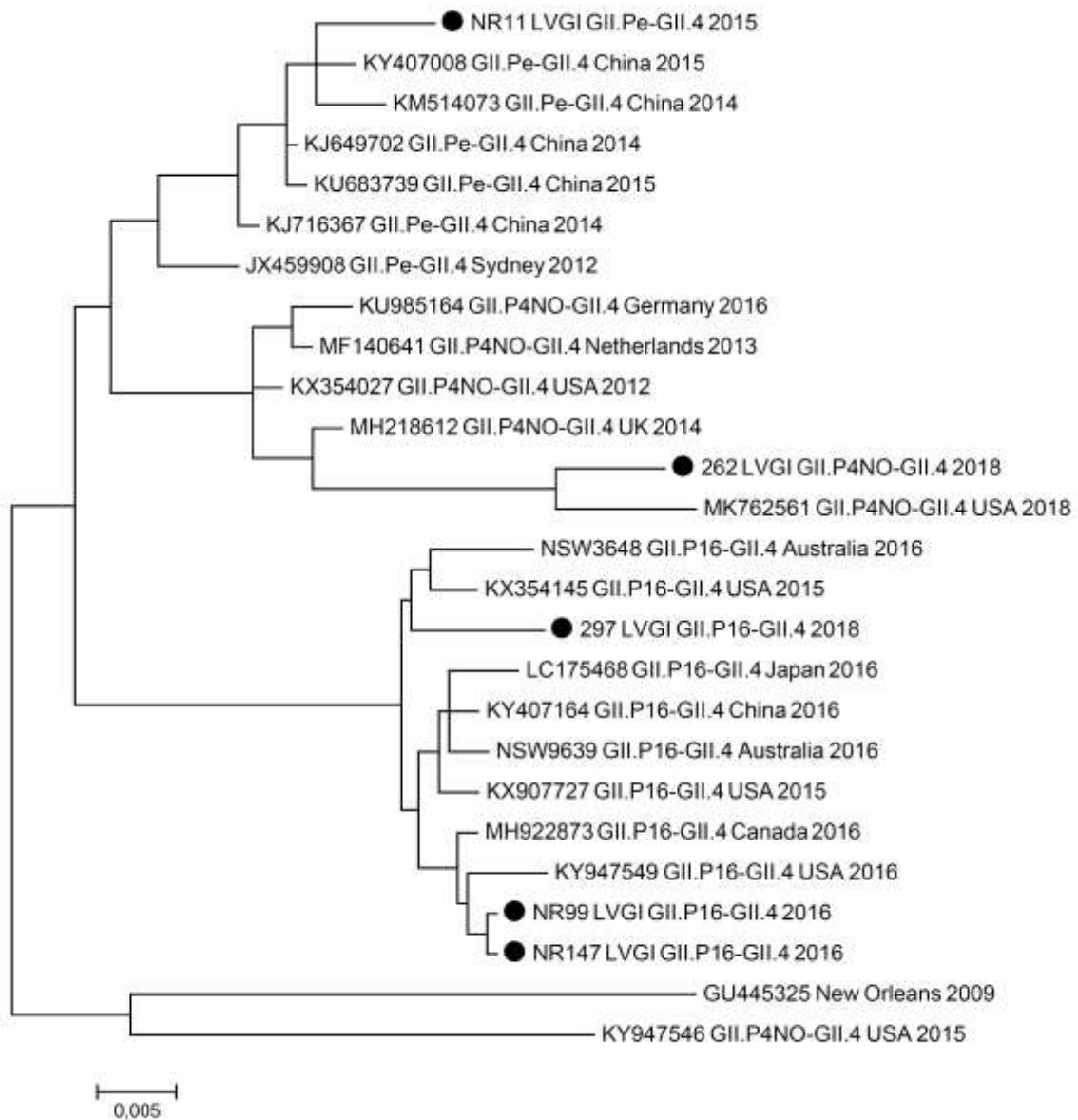


Figura 9. Análise filogenética de sequências completas da proteína VP1 completa do capsídeo GII.4. As cepas pertencentes ao estudo estão marcadas com círculo preto. As cepas referências foram obtidas no GenBank e estão identificadas com o respectivo número de acesso, seguido do país e ano de detecção.

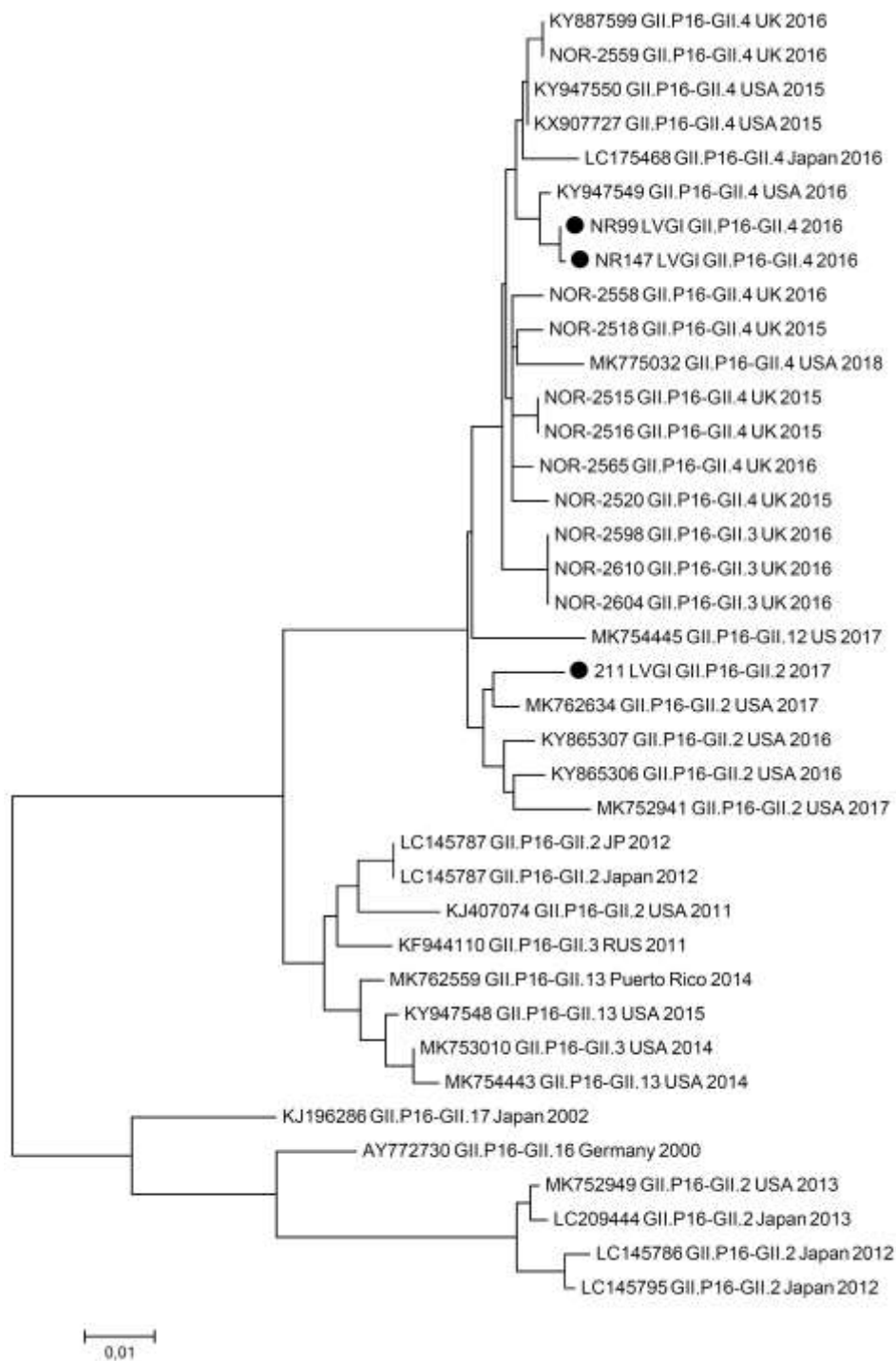


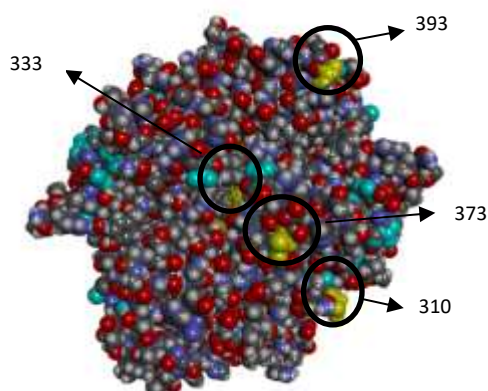
Figura 10. Análise filogenética de sequências quase completas da polimerase GII.P16. As cepas pertencentes ao estudo estão marcadas com círculo preto. A cepas referências foram obtidas no GenBank e estão identificadas com o respectivo número de acesso, seguido do país e ano de detecção.

4.2.3 Análise da variação de aminoácidos

4.2.3.1 Capsídeo (VP1 completa)

Sequências completas da proteína VP1 foram alinhadas e comparadas com sequências das cepas protótipo obtidas no GenBank para a verificação da ocorrência de variação antigênica, especialmente nos sítios putativos antigênicos (epítomos A-E e G) e nos sítios de ligação aos HBGAs.

A)



B)

Capsídeo GII.4 (VP1)	Ano	S*			P2				P1
		119	145	174	NERK	B	A	D	540
					310	333	373	393	
GII.4 New Orleans 2009 (GU445325)	2009	I	I	S	S	V	N	S	L
GII.4 Sydney2012[P31] (JX459908)	2012	V	V	P	D	V	R	G	V
GII.4 Sydney2012[P16] (LC175468)	2016	I	I	S	N	M	H	S	V
GII.4 Sydney 2012[P31] (NR11)	2015	V	V	P	N	M	H	S	L
GII.4 Sydney[P16] (NR99/NR147)	2016	I	I	S	N	M	H	S	V
GII.4 Sydney[P16] (297)	2018	I	I	S	N	M	H	S	V
GII.4 Sydney2012[P4 New Orleans] (262)	2018	V	V	P	N	M	H	S	V

Figura 11. Variação antigênica nos capsídeos GII.4. (A) Posições dos aminoácidos de VP1 onde ocorreram substituições. (B) Comparação entre os

capsídeos GII.4 circulantes com as cepas protótipo. Linhas em cinza: cepas referência. *S: domínio S de VP1; P1 e P2: subdomínios do domínio P de VP1.

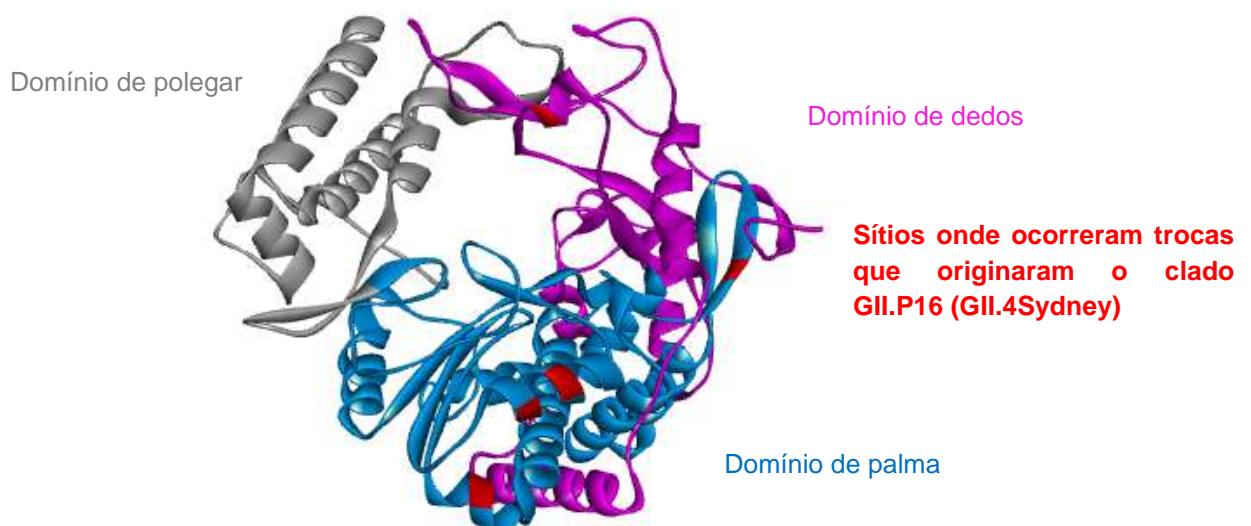
Capsídeo GII.4 Sydney 2012 associado a polimerase GII.Pe que circulou em 2015 foi comparado com o capsídeo protótipo (JX459908). Foram observadas mutações em cinco posições: 310, 333, 373, 393, 540, enquanto o domínio S permaneceu conservado (Figura 3).

Capsídeo GII.4 Sydney 2012 associado a polimerase GII.P16 que emergiu em 2016 foi comparado com o capsídeo protótipo Sydney 2012 (JX459908). Foram observadas mutações em oito posições: 119, 145, 174, 310, 333, 373, 393, 540. Resíduos no domínio S reverteram para sequência encontrada no capsídeo de New Orleans 2009 (variante anterior a Sydney 2012) (Figura 11).

4.2.3.2 Polimerase quase completa

Sequências quase completas da polimerase (~477 aa) foram alinhadas e comparadas com sequências referências obtidas no GenBank para a verificação da ocorrência de variação antigênica, especialmente nas regiões descritas por Ruis *et al* (2017). Foram observadas quatro mutações no domínio de palma (293, 332, 357 e 360) e uma mutação no domínio de dedo (173) (Figura 12).

A)



B)

Cepas	Posições na região da polimerase				
	Dedo	Palma			
	173	293	332	357	360
LC175468	E	T	I	Q	A
KX907727	E	T	I	Q	A
AY772730 (2000)	D	S	V	K	T
LC145787 (2012)	D	S	V	K	T
KF944110 (2011)	D	S	V	K	T
NR99 (2016)	E	T	I	Q	A
NR147 (2016)	E	T	I	Q	A
211 (2017)	E	T	I	H	A

Figura 12. Substituições de aminoácidos observadas na região da polimerase das amostras de 2016 em comparação com cepas referências anteriores ao ano de 2015.

5 DISCUSSÃO

Os norovírus são atualmente reconhecidos como os principais agentes causadores de casos esporádicos de gastroenterite no mundo (Patel *et al*, 2009). São vírus de rápida evolução, devido principalmente aos mecanismos de mutação, responsáveis pelo surgimento de variantes, e de recombinação, principalmente entre ORF1-ORF2 (Cuevas *et al*, 2016; de Graaf *et al*, 2016). Em nosso estudo, descrevemos o predomínio de infecção por norovírus em crianças com gastroenterite esporádica em relação aos rotavírus (24,5% versus 11,%) e uma ampla diversidade de genótipos em diferentes períodos de tempo. Destacamos ainda a detecção de genótipos emergentes na população e de mutações nos genes que codificam a polimerase GII.P16 com diferentes capsídeos virais (GII.4 Sydney 2012 e GII.2) e no capsídeo viral GII.4 Sydney 2012 com diferentes polimerases (GII.P16 e GII.P4 New Orleans 2009), revelando sua notável diversidade genética.

Norovírus do genogrupo GII foram os mais frequentes, com apenas uma cepa GI (GIP7-GI.7) encontrada, o que corrobora com outros estudos, em que GII é reconhecido como o genogrupo mais prevalente no Brasil e no mundo (Barreira *et al*, 2010; Vega *et al*, 2014; Fumian *et al*, 2016; O’Ryan *et al*, 2016; Cantelli *et al*, 2019).

Refletindo a diversidade genética dos norovírus que circulam na população, detectamos seis diferentes capídeos GII (GII.3, GII.6, GII.4 Sydney 2012, GII.17 e GII.1) e cinco diferentes polimerases (GII.P16, GII.P7, GII.Pe, GII.Pg, GII.P17) entre os anos 2014 a 2018. Entre os genótipos do capsídeo, GII.4 foi o mais prevalente na população (76,9%), o que é corroborado por estudos mundiais (Siebenga *et al*, 2009; Cannon *et al*, 2017; Lun *et al*, 2018).

A partir de 1990 são descritas seis variantes pandêmicas GII.4, que emergem a cada 2 ou 3 anos, sendo que a mais recente GII.4 Sydney, associada com a polimerase GII.Pe (GII.4 Sydney[P31]), tem predominado no mundo desde 2012, causando surtos e casos esporádicos de gastroenterite (van Beek 2013; Vinjé *et al*, 2015). GII.4 Sydney[P31] foi detectada em várias regiões do Brasil desde sua emergência (Bittencurt *et al*, 2019; Cantelli *et al*, 2019; Dabila *et al*, 2019). Em nossa área geográfica, esta variante foi reponsável por um surto em unidades pediátricas de um hospital em 2012, mesmo ano do seu primeiro relato o mundo (van Beek *et al*, 2013; Volpini *et al*, 2019- Anexo 4). Observamos que esta recombinante predominou durante todo o ano de 2015 entre as amostras do estudo, quando, no início de 2016, esta variante (GII.4 Sydney 2012) emergiu em nossa área geográfica recombinada com a polimerase GII.P16 (GII.4 Sydney 2012[P16]), aparentemente substituindo a recombinante prévia (GII.4 Sydney 2012[P31]), sendo pela primeira vez relatada no Brasil (Barreira *et al*, 2017 – Anexo 3). Embora o primeiro relato no mundo desta nova recombinante tenha ocorrido em 2016 no Japão (Matsushima *et al*, 2016), posteriores estudos mostraram seu início de circulação em 2015 com subsequente disseminação nos anos seguintes em diversos países, como EUA, Austrália, Nova Zelândia, Canadá e Coréia do Sul, França e Itália (Bidalot *et al*, 2017; Cannon *et al*, 2017; Ruis *et al*, 2017; Lun *et al* 2018; Medici *et al*, 2018; Hasing *et al*, 2019). Recentemente, GII.4 Sydney[P16] foi detectada em um surto ocorrido numa creche em nossa região em março deste ano de 2019 (Dr Túlio

Fumian- comunicação pessoal), afetando também pessoas próximas das crianças e dos funcionários infectados indicando que esta recombinante se mantém na população.

Posteriormente, em 2018, encontramos o capsídeo GII.4 Sydney 2012 em associação com a polimerase GII.P4 New Orleans 2009 (variante anterior a Sydney 2012). Esta recombinante (GII.4 Sydney 2012[P4 New Orleans 2009]) tem sido relatada em diversos países como Austrália, Canadá, EUA, África do Sul (Mans *et al*, 2014; Cannon *et al*, 2017; Lun *et al*, 2018; Hasing *et al*, 2019), porém, no Brasil, ela ainda não foi descrita (Barreira *et al*, 2019 – Anexo 5). Neste cenário, pode-se observar dois eventos separados de recombinação em que o capsídeo GII.4 Sydney foi mantido, levando ao surgimento de GII.4 Sydney[P4 New Orleans 2009] e GII.4 Sydney 2012[P16], e favorecendo a manutenção do capsídeo GII.4 Sydney na população, conforme sugerido por Lun *et al* (2019).

Por sua vez, a polimerase GII.P16, além de recombinada com GII.4 Sydney 2012, também foi encontrada entre nossas amostras com os capsídeos GII.3 entre 2014-2015 e, mais recentemente (2018), também com GII.2. A recombinante GII.2[P16] tem sido descrita desde 2009 (Iritani *et al*, 2012), todavia, entre 2016 e 2017, reemergiu causando súbito aumento de surtos na China, Hong Kong e Alemanha, sendo detectada também no Japão, EUA, França e Austrália (Ao *et al*, 2017; Bidalot *et al*, 2017; Cannon *et al*, 2017; Chan *et al*, 2017; Lun *et al*, 2018; Niendorf *et al*, 2017). No Brasil, recentemente foi relatada, pela primeira vez por Cantelli *et al* (2019) associada à diarreia em crianças na comunidade de Manguinhos, Rio de Janeiro.

É interessante notar que a análise filogenética da polimerase GII.P16, compartilhada pelos capsídeos GII.4 Sydney 2012 e GII.2, mostrou seu agrupamento junto com as polimerases GII.P16 mais recentes, que reemergiram em 2015. Ao contrário, a GII.P16 detectada entre 2014-2015, associada ao capsídeo GII.3, formou em um *cluster* separado (Dados complementares).

Estudos moleculares que analisaram as cepas reemergentes GII.2[P16] e emergentes GII.4 Sydney 2012[P16] encontraram cinco mutações conservativas na região da polimerase GII.P16 em relação à circulação prévia em 2015, quatro delas no domínio de palma, onde se encontra o sítio catalítico da referida enzima

(Ao *et al*, 2018; Barclay *et al*, 2019; Cannon *et al*, 2017; Ruis *et al*, 2017; Lun *et al*, 2019; Tohma *et al*, 2017). Estas mesmas mutações foram encontradas no nosso estudo. Em que pese a pequena quantidade de mutações, tais alterações poderiam ter modificado a fidelidade da polimerase. No caso de GII.2[P16], os estudos sugeriram que não houve mutações no capsídeo GII.2 que poderiam explicar o aumento repentino de sua predominância. De fato, a polimerase tem um papel importante no “fitness” viral, aperfeiçoando (impactando positivamente) a replicação e a transmissão virais (Bull *et al*, 2010; Arias *et al*, 2016). Bull *et al* (2010) descreveram que mutações únicas podem afetar as propriedades biológicas de polimerases da linhagem GII.4 e, curiosamente, uma das mutações (S293T) encontradas na GII.P16 emergente (incluindo as do nosso estudo) possui localização muito próxima ao resíduo 291, que Bull *et al* demonstraram que altera a cinética de polimerases associadas à GII.4 (Bull *et al* 2010).

No tocante à proteína completa do capsídeo (VP1) da cepa emergente GII.4 Sydney 2012[P16], observamos pequenas diferenças ao compararmos com a cepa protótipo (JX459908), as quais também foram relatadas por Lindesmith *et al* (2018) e Lun *et al* (2019). No epítopo A, relacionado à ligação de anticorpos neutralizantes e à emergência de novas variantes GII.4 (Lindesmith *et al*, 2012; 2018), observamos apenas uma mutação (373). No epítopo D, onde estão localizados os sítios de ligação aos HBGAs, também encontramos apenas uma mutação (393). Além disso, observamos uma mutação na posição 310, na qual está localizado o motivo NERK, que regula a conformação estrutural do capsídeo, cuja nova geometria molecular, em tese, dificultaria o acesso aos epítopos. Também observamos mutações no domínio S (119, 145 e 174) assim como Cannon *et al* (2017). Contudo, Barclay *et al* (2019), no que se refere à VP1, não encontraram nenhuma mutação,

Dessa forma, no caso da recombinante GII.4 Sydney 2012[P16], temos duas peculiaridades: (i) a aquisição da polimerase GII.P16 exibindo algumas alterações genéticas quando comparadas à polimerase pré-2015, (ii) e algumas mutações na proteína VP1 do capsídeo.

Além disso, detectamos a cepa emergente GII.17[P17] em 2016 e em 2018. Esta recombinante emergiu entre 2014-2015 como a principal causa de surtos de gastroenterite na China e no Japão e suspeitou-se que estaria

substituindo a variante Sydney 2012 em alguns lugares da Ásia (de Graaf *et al*, 2015; Matsushima *et al*, 2015). Desde então tem sido detectada em várias partes do mundo, porém em baixa prevalência. No Brasil, é detectada desde 2015, também em baixa prevalência (Andrade *et al*, 2017; Silva *et al*, 2017; Cantelli *et al*, 2019).

É digno de nota que GII.6[P7] – uma recombinante não-GII.4 – detectada em 2014 e 2018, foi também observada em 2004 e 2008 em nossa área geográfica (Anexo 5). Esta recombinante possui ampla distribuição geográfica, sendo detectada em diversos países nos últimos anos como EUA, Itália, China, Japão, África do Sul, Burkina Faso, Austrália, Uruguai, Finlândia (Yang *et al*, 2016; Wu *et al*, 2015; Mans *et al*, 2014; Huynen *et al*, 2013; Fajardo *et al*, 2014; Bruggink *et al*, 2016; Puustinen *et al*, 2011). No Brasil, ela foi detectada em diversas regiões, sendo responsável por casos esporádicos e também surtos de gastroenterites (Cantelli *et al*, 2019; Fumian *et al*, 2016; Gondim *et al*, 2018; Hernandez *et al*, 2016).

Em nosso estudo, as cepas GII.6[P7], tanto na análise da polimerase quanto do capsídeo foram subdivididas em três clusters, sugerindo variabilidade genética entre elas. Os vírus GII.6 foram demonstrados distribuídos nos três grupos, GII.6a, GII.6b e GII.6c (Chan-It *et al*, 2012; Vinjé *et al*, 2015). Diakoud *et al* (2019) sugeriram a ocorrência de múltiplos eventos de recombinação entre GII.P7 e GII.6, em contraposição a uma possível evolução linear derivada de um ancestral comum GII.6[P7]. Além disso, Dong *et al* (2019) observaram variação nos aminoácidos na proteína do capsídeo VP1. É importante destacar que observamos a presença desta recombinante em nossa área geográfica em diferentes períodos de tempo, entre 2004 e 2018, em clusters distintos em ambos polimerase e capsídeo, sugerindo que, semelhante à linhagem GII.4, as variantes de GII.6 podem ser substituídas ao longo do tempo, conforme observado por Diakoudi *et al* (2019). Sendo assim, pode-se inferir que esta recombinante GII.6[P7] está em rápida evolução, tentando permanecer na população, requerendo uma atenção em relação à circulação deste genótipo e também em relação às suas variações antigênicas.

A dinâmica circulação dos genótipos de norovírus pode também ser evidenciada na análise de amostras obtidas de indivíduos de nossa área geográfica obtidas em estudos prévios (Anexo 5).

Além da recombinante GII.6[P7], anteriormente mencionada, destacamos a presença das variantes de GII.4 Kaisei 2003, Farmington Hills, Deng Haag 2006b e Yerseke 2006a, coincidindo com a descrição destas no mundo, com aparente substituição sequencial de uma pela outra, além da ausência de todas estas no período recente (2014-2018), no qual a variante Sydney 2012 foi a única observada (Anexo).

Nosso estudo ilustra a notável diversidade genética dos norovirus, em que detectamos grande variedade de cepas, refletindo sua complexa dinâmica epidemiológica. Estudos moleculares são essenciais para detectar de forma precoce novas cepas emergentes. O conhecimento das cepas circulantes na população é importante no desenvolvimento e avaliação da eficácia de vacinas e antivirais.

6 CONCLUSÕES

- Os norovírus foram causa importante de gastroenterite com vômito e diarreia como as principais manifestações clínicas observadas;
- Foi detectada uma grande diversidade de genótipos circulantes: GII.4 Sydney[P16], GII.4 Sydney[P31], GII.17[P17], GII.2[P16], GII.6[P7], GII.3[P16], GII.4 Sydney[PNA], GII.1[Pg], GII.4 Sydney[P4 New Orleans] e GI.7[P7];
- A recombinante emergente GII.4 Sydney[P16] foi pela primeira vez relatada no Brasil;
- Foram detectadas diferentes variantes GII.4 em todos os períodos de coleta de amostras;
- A carga viral não diferiu entre a cepa emergente recombinante de norovírus GII.4 Sydney[P16] que substituiu a anterior GII.4 Sydney [P31];
- Houve variabilidade de aminoácidos na proteína principal do capsídeo, VP1, de cepas GII.4 Sydney 2012 associadas com GII.P16 (2016 e 2018) em comparação com aquelas que circularam antes de 2015 (associadas com GII.Pe);
- A recombinante GII.Pe-GII.4 Sydney 2012 foi a responsável pelo surto em unidade intensiva neonatal em hospital ocorrido em 2012.

7 REFERÊNCIAS

ABU DAHER G, *et al.* Norovirus: a novel etiologic agent in hemolytic uremic syndrome in an infant. **BMC Nephrol**, v. 20, 2019.

ADLER JL, ZICKL R. Winter vomiting disease. **J Infect Dis.**, v. 119, n. 6, p. 668–73, 1969.

AHMED SM, *et al.* Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 14, n. 8, p. 725-30, 2014.

APPLETON H, *et al.* Virus-like particles in winter vomiting disease. **Lancet**, v. 309, n. 8008, p.409-11, 1977.

ARANA A, *et al.* Genotypes, recombinant forms, and variants of norovirus GII.4 in Gipuzkoa (Basque Country, Spain), 2009-2012. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 2009-12, 2014.

ARIAS A, *et al.* Norovirus Polymerase Fidelity Contributes to Viral Transmission In Vivo. **mSphere.**, v. 1, n. 5, 2016.

ATMAR RL, ESTES MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 1, p.15-37, 2001.

ATMAR RL, ESTES MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 35, p. 275-90, 2006.

ATMAR RL, *et al.* Norwalk virus shedding after experimental human infection. **Emerg Infect Dis**, v.14, p.1553-57, 2008.

ATMAR RL, *et al.* Norovirus vaccine against experimental human Norwalk virus illness. **N Engl J Med**, v. 211, n. 6, p. 2178–87, 2011.

AYUKEKBONG JA, *et al.* Pattern of Circulation of Norovirus GII Strains during Natural. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4253–59, 2014.

BAEHNER F, BOGAERTS H, GOODWIN R. Vaccines against norovirus: state of the art trials in children and adults. **Clin Microbiol Infect**, v. 22, suppl. 5, p. 136-39, 2016.

BÁNYAI K, *et al.* Viral gastroenteritis. **Lancet**, v. 392, n. 10142, p. 175-186, 2018.

BARCLAY L, *et al.* Emerging Novel GII.P16 Noroviruses Associated with Multiple Capsid Genotypes. **Viruses**, v. 11, n. 6, 2019.

BARREIRA DM, *et al.* Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. **J Clin Virol**, v. 47, n. 1, p. 60-64, 2010.

BARREIRA DM, *et al.* Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016. **PLoS One**, v. 12, n. 12, 2017.

BEEK JV, *et al.* Indication for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II4 late 2012. **Euro surveillance**, v. 18, n. 1, p. 3–4, 2013.

BELLIOT G, *et al.* In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. **J Virol**, v. 77, p. 10957-74, 2003.

BERTOLOTI-CIARLET A, *et al.* Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. **J Virol**, v. 76, p. 4044-55, 2002.

BERTOLOTI-CIARLET A, *et al.* The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. **J Virol**, v. 77, p. 11603-15, 2003.

BEURET C, *et al.* Norwalk-Like Virus Sequences in Mineral Waters: One-Year Monitoring of Three Brands. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1925–31, 2002.

BIDALOT M, *et al.* Emergence of new recombinant noroviruses GII.p16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017. **Euro Surveill**, v. 22, n. 15, 2017.

BISHOP RF, *et al.* Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, v. 302, n. 7841, p. 1281-83, 1973.

BITENCURT ELR, *et al.* Epidemiological and molecular investigation of norovirus and astrovirus infections in Rio Branco, Acre, Northern Brazil: A retrospective study. **J Med Virol**, v. 91, n. 6, 997-1007, 2019.

BOON D, *et al.* Comparative Evolution of GII . 3 and GII . 4 Norovirus over a 31-Year Period. **Journal of Virology**, v. 85, n. 17, p. 8656–66, 2011.

BRUGGINK LD, MARSHALL JA. Molecular and epidemiological features of GIIb norovirus outbreaks in Victoria, Australia, 2002–2005. **J Med**; v. 81, n. 9, p.1652–60, 2009.

BRUGGINK LD, MARSHALL JA. Altered patterns of norovirus GII.b recombinant forms in gastroenteritis outbreaks in Victoria, Australia, 2002–2005 compared to 2006–2011. **J Med Virol**, v. 85, n. 8, p.1433–43, 2013.

BRUGGINK LD, DUNBAR NL, MARSHALL J A. Emergence of GII.e as a major ORF 1 norovirus genotype and its associated ORF 2 GII.4 variant forms. **Infection, Genetics and Evolution** v. 22, p. 157–63, 2014.

BRUGGINK LD, MOSELEN JM, MARSHALL JA. The Comparative Molecular Epidemiology of GII.P7_GII.6 and GII.P7_GII.7 Norovirus Outbreaks in Victoria, Australia, 2012-2014. **Intervirology** v. 59, n. 1, p. 60–65, 2016.

BULL RA, *et al.* Norovirus Recombination in ORF 1/2 overlap. **Emerging Infectious Diseases** v. 11, n. 7, p. 1079–85, 2005.

BULL RA, *et al.* Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 3, 2010

BULL RA, TANAKA MM, WHITE PA. Norovirus recombination. **J Gen Virol**, v. 12, p. 3347-59, 2007.

CADWELL K, *et al.* Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohns disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. **Cell**, v. 141, p. 1135–45, 2010.

CANNON JL, *et al.* 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**, v. 55, n. 7, p. 2208-21, 2017.

CANTELLI CP, *et al.* High genetic diversity of noroviruses in children from a community-based study in Rio de Janeiro, Brazil, 2014-2018. **Arch Virol.**, v. 164, n. 5, p. 1427-32, 2019.

CAO S, *et al.* Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. **J Virol**, v. 81, p.5949-57, 2007.

CARMONA-VICENTE N, *et al.* Characterization of a novel conformational GII.4 norovirus epitope: Implications in norovirus-host interactions. **Journal of Virology**, v. 90, n. 17, p. 7703-14, 2016.

CHAN MCW, *et al.* Complete Genome Sequence of an Emergent Recombinant GII.P16-GII.2 Norovirus Strain Associated with an Epidemic Spread in the Winter of 2016-2017 in Hong Kong, China. **Genome Announc.**, v. 5, n. 20, 2017.

CHAN-IT W, *et al.* Emergence of a new norovirus GII.6 variant in Japan, 2008-2009. **J Med Virol**, v. 84, n. 7, p. 1089–96, 2012.

CHEN R, *et al.* X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 23, p. 8048-53, 2006.

CHHABRA P, WALIMBE AM, CHITAMBAR SD. Molecular characterization of three novel intergenotype norovirus GII recombinant strains from western India. **Virus Res.**, v. 147, n. 2, p. 242-46, 2010.

CHHABRA P, *et al.* Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. **J Gen Virol.**, v. 100, n. 10, p. 1393-06, 2019.

CHOI YS, *et al.* Re-emergence of a GII.4 Norovirus Sydney 2012 Variant Equipped with GII.P16 RdRp and Its Predominance over Novel Variants of GII.17 in South Korea in 2016. **Food Environ Virol.**, v. 9, n. 2, p. 168-78, 2017.

COLOMBA C, *et al.* Norovirus and gastroenteritis in hospitalized children, Italy. **Emerg Infect Dis**, v. 13, p.1389-91, 2007.

CONLEY MJ, *et al.* Calicivirus VP2 forms a portal-like assembly following receptor engagement. **Nature**, v. 565, n. 7739, p. 377-81, 2019.

CUEVAS JM, *et al.* Human norovirus hyper-mutation revealed by ultra-deep sequencing. **Infect Genet Evol**, v. 41, p. 233-39, 2016.

DÁBILLA N, *et al.* Recombinant noroviruses detected in Mid-West region of Brazil in two different periods 2009-2011 and 2014-2015: Atypical breakpoints of recombination and detection of distinct GII.P7-GII.6 lineages. **Infect Genet Evol**, v. 68, p. 47-53, 2019.

DAHHER GA, *et al.* Norovirus: a novel etiologic agent in hemolytic uremic syndrome in an infant. **BMC Nephrol**, v. 20, n. 1, p. 247, 2019.

DAY JM, *et al.* Metagenomic analysis of the turkey gut RNA virus community. **Virology**, v. 7, 2010.

DE ANDRADE JDAS, *et al.* Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. **J Clin Virol**, v. 3, p. 345-52, 2014.

DE GRAAF M, VAN BEEK J, KOOPMANS MP. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. **Nat Rev Microbiol.**, v. 14, n. 7, p. 421-33, 2016.

DEBBINK K, *et al.* Genetic mapping of a highly variable norovirus GII.4 blockade epitope: potential role in escape from human herd immunity. **Journal of virology** v. 86, n. 2, p. 1214–26, 2012a.

DEBBINK K, *et al.* Norovirus immunity and the great escape. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 10, 2012b.

DEBBINK K, *et al.* Emergence of new pandemic gII.4 sydney norovirus strain correlates with escape from herd immunity. **Journal of Infectious Diseases** v. 208, n. 11, p. 1877–87, 2013.

DEBBINK K, LINDESMITH LC, BARIC RS. The state of norovirus vaccines. **Clin Infect Dis.**, v. 58, n. 12, p. 1746-52, 2014.

DIAKOUDI G, *et al.* Analysis of GII.P7 and GII.6 noroviruses circulating in Italy during 2011-2016 reveals a replacement of lineages and complex recombination history. **Infect Genet Evol.**, v. 75, 2019.

DINGLE KE, *et al.* Human enteric Caliciviridae: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. **J Gen Virol**, v. 76, p. 2349-55, 1995.

DOLIN R, *et al.* Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. **J Infect Dis**, v.123, p.307-12. 1971.

DOLIN R, *et al.* Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 140, p.578-83, 1972.

DOLIN R, *et al.* Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. **J Infect Dis**, v. 146, p.184-9, 1982.

DONALDSON EF, *et al.* Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 231–41, 2010.

EDEN JS, *et al.* Norovirus GII.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in Australia during 2007 and 2008. **J Clin Virol**, v. 49 , p. 265-71, 2010.

EDEN JS, *et al.* Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. **Journal of virology**, v. 87, n. 11, p. 6270–82, 2013.

ETTAYEBI K, *et al.* Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. **Science**, v. 363, n. 6306, p. 1387–93, 2016.

FAJARDO Á, *et al.* Phylogenetic analyses of Norovirus strains detected in Uruguay reveal the circulation of the novel GII.P7/GII.6 recombinant variant. **Infect Genet Evol**, v. 28, p. 328-32, 2014.

FANKHAUSER RL, *et al.* Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. **J Infect Dis**, v. 186, p. 1-7, 2002.

FARKAS T, *et al.* Homologous versus heterologous immune responses to Norwalk-like viruses among crew members after acute gastroenteritis outbreaks on 2 US Navy vessels. **J Infect Dis**, v. 15, p. 187-93, 2003

FARKAS T, *et al.* Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. **J Virol**, v. 82, n. 11, p. 5408–5416, 2008.

FERREIRA MS, *et al.* Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. **Journal of Medical Virology**. v. 80, p. 338-44, 2008.

FERREIRA MS, *et al.* Surveillance of norovirus infections in the state of Rio De Janeiro, Brazil 2005-2008. **Journal of Medical Virology**. v. 82, p. 1442-48, 2010.

FERREIRA MS, *et al.* 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**. v. 7, p. 337-54, 2012.

FIORETTI JM, *et al.* Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–7, 2014.

FRENCK R, *et al.* Predicting Susceptibility to Norovirus GII . 4 by Use of a Challenge Model Involving Humans. v. 206, p. 1386–93, 2012.

FRIESEMA IH, *et al.* Differences in clinical presentation between norovirus genotypes in nursing homes. **J Clin Virol**, v. 46, p. 341-44, 2009.

FUKUDA S, *et al.* Recombinant norovirus implicated in gastroenteritis outbreaks in Hiroshima Prefecture, Japan. **J Med Virol**, v. 80, p. 921-28, 2008.

FUMIAN TM, *et al.* Detection of a novel recombinant strain of norovirus in an African-descendant community from the Amazon region of Brazil in 2008. **Arch Virol.**, v. 157, p. 2389-92, 2012.

FUMIAN TM, *et al.* Quantitative and molecular analysis of noroviruses RNA in blood from children hospitalized for acute gastroenteritis in Belém, Brazil. **Journal of Clinical Virology** v. 58, n. 1, p. 31–35, 2013.

FUMIAN TM, *et al.* Norovirus Recombinant Strains Isolated from Gastroenteritis Outbreaks in Southern Brazil, 2004-2011. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 2016.

GLASS PJ, White LJ, Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. **J Virol**, v. 74, p. 6581-91, 2000

GLASS PJ, Zeng CQ, Estes MK. Two nonoverlapping domains on the Norwalk virus open reading frame 3 (ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions. **J Virol**, v. 77, p.3569-77, 2003.

GONDIM RDG, *et al.* Genetic Diversity of **Norovirus** Infections, Coinfections, and Undernutrition in Children From Brazilian Semiarid Region. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 67, n. 6, p. 117-22, 2018.

GORDON I, INGRAHAM HS, KORNS RF. Transmission of epidemic gastroenteritisto human volunteers by oral administration of fecal filtrates. **J Exp Med**, v. 86, p. 409–22, 1947.

GRAAF M, *et al.* Emergence of a novel GII . 17 norovirus – End of the.of the GII.4 era? **Euro Surveill**, v 20, 2015.

GRAHAM DY, *et al.* Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. **J Infect Dis**, v. 170, p. 34-43, 1994.

GREEN K, *et al.* Caliciviridae: The Noroviruses. In: KNIPE DM, *et al* (Orgs.). **Fields' Virology**, 6. ed, Philadelphia, 2013.

GREENBERG HB, *et al.* Proteins of Norwalk virus. **J Virol**, v. 37, p. 994-99, 1981.

HALE AD, *et al.* Identification of an epitope common to genogroup 1 "norwalk-like viruses". **J Clin Microbiol**, v. 38, p.1656-60, 2000.

HALPERIN T, *et al.* Molecular analysis of noroviruses involved in acute gastroenteritis outbreaks in military units in Israel, 1999-2004. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 24, p. 697-700, 2005.

HAMANO M, *et al.* Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by Noroviruses in Okayama, Japan. **J Med Virol**, v. 77, p. 282-89, 2005.

HANSMAN GS, *et al.* Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. **Arch Virol**, v. 149, p. 1673-88, 2004.

HARDY ME, ESTES MK. Completion of the Norwalk virus genome sequence **Virus Genes**, v. 12, p. 287-90, 1996.

HARDY ME, *et al.* Human calicivirus genogroup II capsid sequence diversity revealed by analyses of the prototype Snow Mountain agent. **Arch Virol.**, v. 142, p. 1469-79, 1997.

HARDY ME, *et al.* Antigenic mapping of the recombinant Norwalk virus capsid protein using monoclonal antibodies. **Virology**, v. 217, p. 252-61, 1996.

HARDY ME, *et al.* Substrate specificity of the Norwalk virus 3C-like proteinase. **Virus Res**, v. 89, p. 29-39, 2002.

HASING ME, *et al.* Changes in norovirus genotype diversity in gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2012-2018. **BMC Infect Dis**, v. 19, 2019.

HERNANDEZ JDM, *et al.* 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.**, v. 39, p. 365-71, 2016.

HERNANDEZ JM, *et al.* Molecular epidemiology and temporal evolution of norovirus associated with acute gastroenteritis in Amazonas state, Brazil. **BMC Infect Dis**, v. 147, 2018.

HIGUCHI Y, *et al.* Clinical epidemiology and treatment of febrile and afebrile convulsions with mild gastroenteritis: a multicenter study. **Pediatr Neurol**, v. 67, p. 78–84, 2017.

HOA TRAN TN, *et al.* Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. **J Clin Virol.**, v. 56, n. 3, p.185-93, 2013.

HOFFMANN D, *et al.* New norovirus classified as a recombinant GII.g/GII.1 causes an extended foodborne outbreak at a university hospital in Munich. **J Clin Virol.**, v. 58, p. 24-30, 2013.

HUANG P, *et al.* Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. **J Infect Dis**, v. 188, p. 19-31, 2003.

HUTSON AM, ATMAR RL, ESTES MK. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. **Trends Microbiol**, v. 12, p. 279-87, 2004.

HUYNEN P, *et al.* Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. **J Clin Virol.**, v. 58, n. 3, p. 515-21, 2013.

IRITANI N, *et al.* Prevalence of Norwalk-like virus infections in cases of viral gastroenteritis among children in Osaka City, Japan. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 1756-9, 2003.

IRITANI N, *at al.* Increase of GII.2 norovirus infections during the 2009-2010 season in Osaka City, Japan. **J Med Virol.**, v. 84, p. 517-25, 2012.

JIANG X, *et al.* Norwalk virus genome cloning and characterization. **Science**, v. 250, p. 1580-83, 1990.

JONES MK, *et al.* Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of cells. **Science**, v. 346, n. 6210, p. 755–59, 2014.

JORDAN WS Jr, GORDON I, DORRANCE WR. A study of illness in a group of Cleveland families. VII. Transmission of acute non-bacterial gastroenteritis to volunteers: evidence for two different etiologic agents. **J Exp Med**, v. 98, p. 461-75, 1953.

KAGEYAMA T, *et al.* Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n. 4, p. 1548–57, 2003.

KAPIKIAN AZ, *et al.* Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **J Virol**, v. 10, p.1075-81, 1972.

KARST SM, *et al.* Advances in norovirus biology. **Cell Host Microbe**, v. 15, n. 6, p. 668-80, 2014.

KATAYAMA K, *et al.* Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. **Virology**, v. 299, p. 225-39, 2002.

KIM BR, *et al.* Incidence and characteristics of norovirus-associated benign convulsions with mild gastroenteritis, in comparison with rotavirus ones. **Brain Dev**, v. 40, n. 8, p. 699–706, 2018.

KIM JE, *et al.* Genetic analysis of the capsid region of norovirus GII.4 variants isolated in South Korea. **J Microbiol.**, v. 52, n. 5, p. 427-34, 2014.

KOJIMA S, *et al.* Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 100, n. 1–2, p. 107–114, 2002.

KRONEMAN A, *et al.* An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 51, n. 2, p. 121–25, 2011.

KRONEMAN A, *et al.* Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. **Arch Virol.**, v. 158, n. 10, p. 2059-68, 2013.

KUMAR S, TAMURA K, NEI M. Meg3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief Bioinf**, v. 5, p. 150-163, 2004.

L'HOMME Y, *et al.* Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. **Virus Genes**, v. 39, n. 1, p. 66–75, 2009.

LAMBDEN PR, LIU B, CLARKE IN. A conserved sequence motif at the 5' terminus of the Southampton virus genome is characteristic of the Caliciviridae. **Virus Genes**, v. 10, p. 149-52, 1995.

LE PENDU J. Histo-blood group antigen and human milk oligosaccharides: genetic polymorphism and risk of infectious diseases. **Adv Exp Med Biol**, v. 554, p. 135-43, 2004.

LE PENDU J, *et al.* Mendelian resistance to human norovirus infections. **Semin Immunol**, v. 18, p. 375-86, 2006.

LIM KL, *et al.* A Multi-Site Study of Norovirus Molecular Epidemiology in Australia and New Zealand, 2013-2014. **PLoS One**, v. 11, n. 14, p. 2013–14, 2016

LINDESMITH LC, *et al.* Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. **Nature Medicine**, v. 9, p. 548-53, 2003.

LINDESMITH LC, *et al.* Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. **PLoS Med**, v. 5, n. 2, 2008.

LINDESMITH LC, *et al.* Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, 2012.

LINDESMITH LC, *et al.* Antigenic Characterization of a Novel Recombinant GII.P16-GII.4 Sydney Norovirus Strain With Minor Sequence Variation Leading to Antibody Escape. **J Infect Dis.**, v. 217, n. 1, p. 1145-52, 2018.

LUDWIG-BEGALL LF, MAUROY A, THIRY E. Norovirus recombinants: recurrent in the field, recalcitrant in the lab - a scoping review of recombination and recombinant types of noroviruses. **J Gen Virol.**, v. 99, n. 8, p. 970-88, 2018.

LIU L, *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. **Lancet**, v. 385, p. 430-40, 2015.

LUN JH, *et al.* Recombinant GII.P16/GII.4 Sydney 2012 Was the Dominant Norovirus Identified in Australia and New Zealand in 2017. **Viruses**, v. 10, n. 10, 2018.

- MAHAR JE, KIRKWOOD CD. Characterization of norovirus strains in Australian children from 2006 to 2008: prevalence of recombinant strains. **J Med Virol**, v. 83, p. 2213-19, 2011.
- MAHAR JE, *et al.* The Importance of Intergenic Recombination in Norovirus GII.3 Evolution. **Journal Virology**, v. 87, n. 7, p. 3687–98, 2013.
- MALASAO R, *et al.* Genetic diversity of norovirus, sapovirus, and astrovirus isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. **J Med Virol**, v. 80, p. 1749-55, 2008.
- MALLORY ML, *et al.* GII.4 Human Norovirus: Surveying the Antigenic landscape. **Viruses**, v. 11, n. 2, 2019
- MANS J, MURRAY T, TAYLOR M. Novel norovirus recombinants detected in South Africa. **Virology Journal**, v. 11, p. 1–9, 2014.
- MANS J, *et al.* Norovirus diversity in children with gastroenteritis in South Africa from 2009 to 2013: GII.4 variants and recombinant strains predominate. **Epidemiol Infect.**, v. 144, p. 907-16, 2016.
- MARIONNEAU S, *et al.* Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. **Gastroenterology**, v. 122, p. 1967-77, 2002.
- MARKS PJ, *et al.* Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. **Epidemiol Infect**, v. 124, p. 481-87, 2000.
- MARKS PJ, *et al.* A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. **Epidem Inf**, v, 131, p. 727-36, 2003.
- MARSHALL JK, *et al.* Postinfectious irritable bowel syndrome after a food-borne outbreak of acute gastroenteritis attributed to a viral pathogen. **Clin. Gastroenterol. Hepatol**, v. 5, n. 4, p. 457–60, 2007.
- MATHIJS E, *et al.* Novel norovirus recombinants and of GII . 4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium. **Virology Journal** v. 8, n. 1, p. 310, 2011.

MATSUSHIMA Y, ISHIKAWA M, SHIMIZU T. Genetic analyses of GII. 17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence. **Euro**, v. 308, p. 1–6, 2015.

MATSUSHIMA Y, *et al.* Complete Genome Sequence of a Recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus Detected in Kawasaki City, Japan, in 2016. **Genome Announcements**, v. 4, n. 5, p. 5–6, 2016.

MEDICI MC, *et al.* Novel recombinant GII.P16_GII.13 and GII.P16_GII.3 norovirus strains in Italy. **Virus Research** v. 188, p. 142–45, 2014.

MEDICI MC, *et al.* Epidemiological and molecular features of norovirus infections in Italian children affected with acute gastroenteritis. **Epidemiol Infect.**, v. 142, p. 2326-35, 2014.

MEDICI MC, *et al.* Emergence of novel recombinant GII.P16_GII.2 and GII.P16_GII.4 Sydney 2012 norovirus strains in Italy, winter 2016/2017. **New Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 71-72, 2018.

MIKALSEN AB, *et al.* Characterization of a novel calicivirus causing systemic infection in atlantic salmon (*Salmo salar* L.): proposal for a new genus of Caliciviridae. **PLoS One**, v. 9, n. 11, 2014.

MOR SK, *et al.* Genomic characterization of a novel calicivirus, FHMCV-2012, from baitfish in the USA. **Arch Virol**, v. 162, n. 12, p. 3619–27, 2017.

MORI K, *et al.* Genomic Analysis of the Evolutionary Lineage of Norovirus GII . 4 From Archival Specimens During 1975 – 1987 in Tokyo. **J Med Virol.**, v. 89, n. 2, p. 363–67, 2017.

NAHAR S, *et al.* Novel intergenotype human norovirus recombinant GII.16/GII.3 in Bangladesh. **Infection, Genetics and Evolution** v. 20, p. 325–29, 2013.

NGUYEN GT, *et al.* A systematic review and meta-analysis of the prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis in developing countries. **Medicine (Baltimore)**, v. 96, n. 40, 2017.

NIENDORF S, *et al.* Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, Germany, winter 2016. **Euro Surveill.**, v. 22, n. 4, 2017.

NORDGREN J, *et al.* Innate Resistance and Susceptibility to Norovirus Infection. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 4, p. 13–17, 2016.

NORDGREN J, SVENSSON L. Genetic Susceptibility to Human Norovirus Infection: An Update. **Viruses**, v. 11, n. 3, 2019.

OKHUYSEN PC, *et al.* Viral shedding and fecal IgA response after Norwalk virus infection. **J Infect Dis**, v. 171, p. 566-69, 1995.

O'RYAN M, RIERA-MONTES M, LOPMAN B. Norovirus in Latin America: Systematic Review and Meta-Analysis. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 17, 2016.

PARRA G, GREEN K. Genome of Emerging Norovirus GII.17, United States, 2014. **Emerg Infect Dis.**, v. 21, n. 8, p. 2014–16, 2015.

PARRA G, *et al.* Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 1, 2017.

PARRINO TA, *et al.* Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. **N Engl J Med**, v. 297, p. 86-89, 1977.

PATEL MM, *et al.* Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. **Emerg Infect Dis**, v. 14, p. 1224-31, 2008.

PATEL MM, *et al.* Noroviruses: a comprehensive review. **J Clin Virol.**, v. 44, p. 1-8, 2009.

PAYNE DC, *et al.* Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children. **N Engl J Med.**, v.368, p. 1121-30, 2013.

PHAN TG, *et al.* Viral diarrhea in Japanese children: results from a one-year epidemiologic study. **Clin Lab**, v. 51, p. 183-91, 2005.

PIRES SM, *et al.* Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. **PloS One** v. 10, p. 1–17, 2015.

PORTAL TM, *et al.* Genetics and Molecular Microbiology Caliciviruses in hospitalized children, São Luís, Maranhão, 1997 – 1999: detection of norovirus GII . 12. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 47, n. 3, p. 724–30, 2016.

PRASAD BV, *et al.* X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. **Science**, v. 286, p. 287-90, 1999.

PUUSTINEN L, *et al.* Noroviruses as a major cause of acute gastroenteritis in children in Finland, 2009–2010. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases** v. 43, n. 10, p. 804–08, 2011.

RACKOFF LA, *et al.* Epidemiology and Evolution of Rotaviruses and Noroviruses from an Archival WHO Global Study in Children (1976 – 79) with Implications for Vaccine Design. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.

REIMANN HA, PRICE AH, HODGES JH. The cause of epidemic diarrhea, náusea and vomiting (viral dysentery?). **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 59, p. 8-9, 1945.

RIBEIRO LR, *et al.* Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 201-06, 2008.

ROCHA-PEREIRA J, DYCKE JV, NEYTS J. ScienceDirect Norovirus genetic diversity and evolution: implications for antiviral therapy. **Current Opinion in Virology** v. 20, p. 92–98, 2016

ROCKX B, *et al.* Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. **Clin Infect Dis**, v. 35, p. 246-53, 2002.

ROCKX B, *et al.* Characterization of the homo- and heterotypic immune responses after natural norovirus infection. **J Med Virol**, v. 77, p. 439-46, 2005.

RUIS C, *et al.* The emerging GII.P16-GII.4 Sydney 2012 norovirus lineage is circulating worldwide, arose by late-2014 and contains polymerase changes that may increase virus transmission. **PLoS One**, v. 12, n. 6, 2017.

SANG S, *et al.* Report of Recombinant Norovirus GII . g / GII . 12 in Beijing. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. 1–7, 2014.

SEAH EL, *et al.* Open reading frame 1 of the Norwalk-like virus Camberwell: completion of sequence and expression in mammalian cells. **J Virol**, v. 73, p.10531-35, 1999.

SILVA LD, *et al.* Detection of the pandemic norovirus variant GII.4 Sydney 2012 in Rio Branco, state of Acre, northern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 1068-70, 2013.

SILVA LD, *et al.* Detection and genetic characterization of the emergent GII.17_2014 norovirus genotype among children with gastroenteritis from Northern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution** , v. 48, p. 1-3, 2017.

SIMMONS K, *et al.* Duration of immunity to norovirus gastroenteritis. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 8, p.1260–67, 2013.

SIQUEIRA JAM, *et al.* Characterization of novel intragenotype recombination events among norovirus pandemic GII.4 variants. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 44, p. 361–66, 2016.

SIQUEIRA JAM, *et al.* Molecular analysis of norovirus in specimens from children enrolled in a 1982-1986 study in Belém, Brazil: A community-based longitudinal study. **J Med Virol**, v. 89, n. 11, p. 1894-03, 2017.

SIQUEIRA JAM, *et al.* Genotype diversity and molecular evolution of noroviruses: A 30-year (1982-2011) comprehensive study with children from Northern Brazil. **PLoS One**, v. 12, n. 6, 2017.

SOSNOVTSEV SV, *et al.* Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. **J Virol**, v. 79, n. 7, p. 4012-24, 2005.

TAKANASHI S, *et al.* Characterization of Emerging GII . g / GII . 12 Noroviruses from a Gastroenteritis Outbreak in the United States in 2010. **J Clin Microbiol.**, v. 49, n. 9, p. 3234–44, 2011.

TAKEDA initiates world's first norovirus vaccine field trial. **Laboratório Takeda, 2016**. Disponível em: <<https://www.takeda.com/newsroom/newsreleases/2016/takeda-initiates-worlds-first-norovirus-vaccine-field-trial/>>. Acesso em: 16 de outubro de 2019.

TAMURA K, *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol. Biol. Evol**, v. 30, n. 12, p. 2725-29, 2013.

TAN M, *et al.* Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. **J Virol**, v. 77, p. 12562-71, 2003.

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**, v. 79, p. 14017-30, 2005.

TEUNI PF, *et al.* Norwalkvirus: How infectious is it? **J. Med. Virol**, v. 80, n. 8, p. 1468–76, 2008.

THORNHILL TS, *et al.* Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. **J Infect Dis**, v. 135, p. 20-27, 1977.

TOHMA K, *et al.* *Phylogenetic Analyses Suggest that Factors Other Than the Capsid Protein Play a Role in the Epidemic Potential of GII.2 Norovirus.* **mSphere**, v. 2, n. 3, p. 2017.

TOHMA K, *et al.* Population Genomics of GII.4 Noroviruses Reveal Complex Diversification and New Antigenic Sites Involved in the Emergence of Pandemic Strains. **MBio**, v. 10, n. 5, 2019.

TUCKER SN, *et al.* Oral adenoviral-based vaccines: historical perspective and future opportunity. **Exp Rev Vaccines**, v. 7, n. 1, p.25–31, 2008.

VAN DYCKE J, *et al.* A robust human norovirus replication model in zebrafish larvae. **PLoS Pathog**, v. 15, n. 9, 2019.

VEGA E, *et al.* Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. **Emerg Infect Dis.**, v. 17, n. 8, p. 1389-95, 2011.

VICENTINI F, *et al.* Molecular characterization of noroviruses and HBGA from infected Quilombola children in Espirito Santo State, Brazil. **PLoS One**, v. 22, 2013.

VICTORIA M, *et al.* Bayesian coalescent inference reveals high evolutionary rates and expansion of Norovirus populations. **Infect Genet Evol.**, v. 9, n. 5, p 927-32, 2009.

VIDAL R, *et al.* Caliciviruses and foodborne gastroenteritis, Chile. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 7, p. 134-37, 2005.

VINJÉ J, ALTENA SA, KOOPMANS MP. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. **J Infect Dis**, v. 176, p. 1374–78, 1997.

VINJÉ J, *et al.* Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". **Arch Virol**, v. 145, n. 2, p. 223-41, 2000.

VINJÉ J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 2, p. 373-81, 2015.

VINJÉ J, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. **J General Virology**, v.100, n.11, 2019.

VOLPINI LPB, et al. An outbreak due to a norovirus GII.Pe-GII.4 Sydney_2012 recombinant in neonatal and pediatric intensive care units. **J Infect Public Health**, 2019.

VONGPUNSAWAD S, VENKATARAM PBV, ESTES MK. Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. **J Virol**, v. 87, n. 8, p. 4818-25, 2013.

WANG YH, et al. Molecular epidemiology of noroviruses in children and adults with acute gastroenteritis in Wuhan, China, 2007-2010. **Arch Virol**, v. 157, p. 2417-24, 2012.

WESTRELL T, et al. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. **Euro Surveill**, v. 15, n. 12, 2010.

WHITE PA. Evolution of norovirus. **Clinical Microbiology and Infection** v. 20, n. 8, p. 741–45, 2014.

WILHELMI I, ROMAN E, SÁNCHEZ-FAUQUIER A. Viruses causing gastroenteritis. **Clin Microbiol Infect**, v. 9, p. 247-62, 2003.

WOLF S, REETZ J, OTTO P. Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. **Arch Virol**, v. 156, n. 7, p.1143–50, 2011.

WU X, et al. Prevalence and genetic diversity of noroviruses in adults with acute gastroenteritis in Huzhou, China, 2013 – 2014. **Archives of Virology** v. 160, n. 7, p. 1705–13, 2015.

YANG Z, et al. Complete Genome Sequence of Human Norovirus Strain GII.P7-GII.6 Detected in a Patient in the United States in 2014. **Genome Announc.**, v. 4, n. 5, 2016.

YUEN LK, et al. Heminested multiplex reverse transcription-PCR for detection and differentiation of Norwalk-like virus genogroups 1 and 2 in fecal samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2690–94, 2001.

ZHENG DP, *et al.* Norovirus classification and proposed strain nomenclature.
Virology, v. 346, p. 312-23, 2006.

ANEXO 1

Ficha de investigação

Nome do paciente _____	Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>
Data de nascimento _____	Idade: _____
Nome da mãe _____	Número: _____
Logradouro: _____	CEP: _____
Complemento: _____	UF: _____
Bairro: _____	
Município: _____	
Telefone: _____	
Vômitos - nº de episódios/24 horas: _____	Duração (dias): _____
Diarréia - nº de episódios/24 horas: _____	Duração (dias): _____
Sintomas respiratórios (tosse ou coriza) _____	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Anorexia _____	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Dor abdominal _____	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Encaminhado _____	TRO <input type="checkbox"/> EV <input type="checkbox"/>
Febre _____	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Aleitamento materno _____	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Se sim _____	exclusivo <input type="checkbox"/> misto <input type="checkbox"/>
Vacina Rotavírus _____	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
1ª dose (data) _____	Lote _____
2ª dose (data) _____	Lote _____
	Temperatura _____ °C
	Até quando? _____ mês(es)
	Laboratório _____
	Laboratório _____

ANEXO 2

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Diversidade genética de rotavírus do grupo A e de norovirus em crianças com diarreia aguda e avaliação do fenótipo ABH, Lewis e secretor como determinante da susceptibilidade à infecção

Pesquisador: Liliana Cruz Spano

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 28640414.5.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESPIRITO SANTO - FAPES

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.312.166

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa submetido à FAPES (Edital FAPES/CNPq/MS-Decit/SESA nº 10/2013 - PPSUS), tendo como pesquisadora responsável a Professora Liliana Cruz Spano do Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo. Também participam da equipe de pesquisa, outros pesquisadores da Universidade Federal do Espírito, além de pesquisadores do Centro Universitário Norte da Universidade Federal do Espírito, da Fundação Oswaldo Cruz, e da Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo.

Os rotavírus (RV) e norovírus (NoV), constituídos por distintos genótipos e variantes, são as principais causas de morbidade e mortalidade de crianças com diarreia e medidas de saneamento e de higiene conferem pouco impacto na prevenção. Controle da infecção pelo RV baseia-se em estratégia imunopreventiva, cujo sucesso deve ser acompanhado pelo monitoramento de genótipos circulantes. Susceptibilidade à infecção tem sido em parte determinada pelos receptores celulares para ambos os vírus, como os antígenos de grupo sanguíneo (HBGA).

Este estudo propõe analisar a diversidade genética de RV do grupo A (RV-A) e de NoV em crianças com diarreia aguda atendidas em Pronto Socorro ou hospitalizadas em hospitais e PA (HINSG-

Endereço: Av. Marechal Campos 1468
Bairro: S/N
UF: ES **Município:** VITORIA **CEP:** 29.040-091
Telefone: (27)3335-7211 **E-mail:** cep@ccs.ufes.br

Página 01 de 09

Continuação do Parecer: 1.312.166

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLÉ.pdf	08:47:29		Aceito
--	----------	----------	--	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VITORIA, 06 de Novembro de 2015

Assinado por:
Cynthia Furst Leroy Gomes Bueloni
(Coordenador)

RESEARCH ARTICLE

Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016

Débora Maria Pires Gonçalves Barreira^{1,2*}, Túlio Machado Fumian^{2,3}, Marco André Loureiro Tonini¹, Lays Paula Bondi Volpini¹, Rodrigo Pratte Santos¹, Anézia Lima Chaves Ribeiro³, José Paulo Gagliardi Leite², Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza², Patricia Brasil⁴, Denise Cotrim da Cunha⁵, Marize Pereira Miagostovich², Líliliana Cruz Spano¹

1 Laboratory of Virology and Infectious Gastroenteritis, Pathology Department, Health Science Center, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brazil, **2** Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **3** Central Laboratory of Public Health, Av. Marechal Mascarenhas de Moraes 2025, Bento Ferreira, Vitória, ES, Brazil, **4** Acute Febrile Illnesses Laboratory, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **5** Sérgio Arouca Public Health National School, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.
* deborambareira@yahoo.com.br



OPEN ACCESS

Citation: Barreira DMPG, Fumian TM, Tonini MAL, Volpini LPB, Santos RP, Ribeiro ALC, et al. (2017) Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016. *PLoS ONE* 12(12): e0189504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189504>

Editor: Pierre Roques, CEA, FRANCE

Received: August 22, 2017

Accepted: November 28, 2017

Published: December 13, 2017

Copyright: © 2017 Barreira 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: All relevant data are within the paper.

Funding: This study was supported by Espírito Santo Research Foundation (FAPES)/National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Department of Science and Technology (Decit) – Secretary of Science Technology and Strategic Inputs (SCTIE)—Health Ministry (MS)/Health's Secretary (SESA) (no.10/2013-PPSUS), and PROEP/CNPQ (no. 402135/2011-3). The first author had a scholarship from

Abstract

Noroviruses are the leading cause of acute gastroenteritis (AGE) in all age groups worldwide. Despite the high genetic diversity of noroviruses, most AGE outbreaks are caused by a single norovirus genotype: GII.4. Since 1995, several different variants of norovirus GII.4 have been associated with pandemics, with each variant circulating for 3 to 8 years. The Sydney_2012 variant was first reported in Australia and then in other countries. A new variant, GII.P16-GII.4, was recently described in Japan and South Korea and then in the USA, France, Germany and England. In our study, 190 faecal specimens were collected from children admitted to a paediatric hospital and a public health facility during a surveillance study of sporadic cases of AGE conducted between January 2015 and July 2016. The norovirus was detected by RT-qPCR in 51 samples (26.8%), and in 37 of them (72.5%), the ORF1-2 junction was successfully sequenced. The new recombinant GII.P16-GII.4 Sydney was revealed for the first time in Brazil in 2016 and predominated among other strains (9 GII.Pe-GII.4, 3 GII.P17-GII.17, 1 GII.Pg-GII.1, 1 GII.P16-GII.3 and 1 GII.PNA-GII.4). The epidemiological significance of this new recombinant is still unknown, but continuous surveillance studies may evaluate its impact on the population, its potential to replace the first recombinant GII.Pe-GII.4 Sydney 2012 variant, and the emergence of new recombinant forms of GII.P16.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Infection and Public Health

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/jiph>

An outbreak due to a norovirus GII.Pe-GII.4 Sydney_2012 recombinant in neonatal and pediatric intensive care units

Lays P.B. Volpini*, Débora M.P.G. Barreira, Priscila L. da Silva Almeida, Liliana C. Spano

Department of Pathology, Center of Health Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2019

Received in revised form 28 May 2019

Accepted 18 June 2019

Keywords:

Norovirus
Recombinant
Outbreak
Hospital

ABSTRACT

Background: Noroviruses are the major cause of gastroenteritis outbreaks worldwide in all age groups. The several genotypes, mutation, and recombination events guarantee the broad diffusion and maintenance of these viruses in the general human population. We described an outbreak caused by a norovirus recombinant strain screened in samples obtained from children and hospital staff affected in an outbreak of diarrhea at neonatal and pediatric intensive care units in Southeastern Brazil.

Methods: Noroviruses were investigated by PCR and the genotype was determined by sequencing both partial genes regions of RNA-dependent RNA-polymerase (ORF1) and capsid protein (ORF2); the recombination event was performed using SimPlot. Rotaviruses were investigated by real-time PCR targeting the NSP3 gene.

Results: The GII.Pe-GII.4 Sydney_2012 norovirus recombinant was detected in four from among six children with diarrhea and in four symptomatic contacts; the rotavirus was negative in all samples. The virus was introduced by a hospital staff member affecting other staff members and patients of the pediatric intensive care unit. Five days lapsed between the first and last diarrhea case caused by norovirus and the outbreak was restrained through strict hand hygiene, environment disinfection and limiting the contact of infected persons.

Conclusions: The outbreak was due to the GII.Pe-GII.4 Sydney_2012 variant that occurred in the same year of its first description in the world.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier Limited on behalf of King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Noroviruses are the major cause of acute nonbacterial gastroenteritis in all age groups and are responsible for 212,000 deaths annually worldwide [1]. Highly infectious, these viruses are a major cause of outbreaks, especially in enclosed settings such as hospitals, cruise ships, and schools due to the close contact among infected individuals [2]. Routes for spread in healthcare settings occur mainly through person-to-person transmissions [3].

Belonging to the *Caliciviridae* family, noroviruses are small non-enveloped viruses with icosahedral symmetry and a positive-sense, single-stranded RNA genome, organized as three open reading frames (ORFs) [4,5]. ORF1 encodes a polyprotein cleaved into seven nonstructural proteins involved in viral replication, including RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). ORF2 and ORF3 encode, respectively, the major (VP1) and minor structural capsid proteins (VP2) [6–8]. Due to a frequent recombination event

between an ORF1-ORF2 junction, both regions are recommended for dual nomenclature [9] in order to facilitate the tracking of noroviruses [10].

Amongst seven genogroups (GI–GVII) of noroviruses, GI, GII and GIV infect human beings and are classified into more than 40 genotypes based on RdRp (ORF1) or VP1 (ORF2) sequences [11]. The GII.4, more frequently associated with transmission mediated by person-person contact, is the most common genotype detected in outbreaks of gastroenteritis around the world and health care settings [12]. Since the 1990s, eight variants of this genotype have emerged due to mutational and recombination events and were associated with pandemics of acute gastroenteritis causing millions of infections annually: Grimsby-US_95/96, Farmington Hills_2002, Hunter_2004, Yerseke_2006a, Den Haag_2006b, New Orleans_2009, Sydney_2012 [11], and the most recent Sydney-2015, which obtained a new RdRp (GII.P16) through recombination [13].

In this study, we have described a norovirus outbreak due to the last GII.Pe-GII.4 Sydney_2012 variant found in a neonatal (NICU) and pediatric intensive care unit (PICU) of a hospital in the Southeastern region of Brazil occurring in the same year of the first description of this variant in Australia [14].

* Corresponding author.

E-mail address: layspaul290@gmail.com (L.P.B. Volpini).

<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.012>

1876-0341/© 2019 The Authors. Published by Elsevier Limited on behalf of King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article in press as: Volpini LPB, et al. An outbreak due to a norovirus GII.Pe-GII.4 Sydney_2012 recombinant in neonatal and pediatric intensive care units. *J Infect Public Health* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.012>

ANEXO 5

Genetic diversity of noroviruses in different periods of time in all age individuals, Southeastern Brazil.

Debora Maria Pires Gonçalves Barreira^{a,*¶}, Luciana Bueno de Freitas Santolim^b, Lays Paula Bondi Volpini^a, Izabella de Oliveira Franco^a, Taiz Pereira Gomes^a, Marco André Loureiro Tonini^{a,c}, Liliana Cruz Spano^a

^a Laboratory of Virology and Infectious Gastroenteritis, Pathology Department, Health Science Center, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, 29043-900 Maruípe, Vitória, ES, Brazil

^c Clinical Laboratory Unit, Microbiology Sector, University Hospital of Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, 29043-900 Maruípe, Vitória, ES, Brazil

* Corresponding author: Lab. Virologia e Gastroenterite Infecciosa, Depto Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, 29043-900 Maruípe, Vitória, ES, Brasil. Tel.: +55 27 33357297. E-mail address: deborambarreira@yahoo.com.br

1. Introduction

Noroviruses are a major cause of acute gastroenteritis worldwide, affecting individuals of all ages (Ahmed 2014). Although norovirus infections are self-limiting, they can cause severe and prolonged symptoms in vulnerable populations, such as young children, elderly and immunocompromised patients. Noroviruses belong to the *Caliciviridae* family and their ~ 7.5 Kb single-stranded positive-sense RNA genome is organized into three open reading frames (ORFs). The ORF1 encodes a nonstructural polyprotein that is cleaved into six proteins, including a RNA polymerase (RdRp), ORF2 and ORF3 encode the major (VP1) and the minor capsid protein (VP2), respectively (Green 2013). Additionally, VP1 is divided into two domains, shell (S) and protruding (P), with the latter consisting of P1 and P2 subdomains, being P2 the most surface-exposed region of the norovirus capsid facilitating their interaction with neutralizing antibodies and histo-blood group antigens (HBGA) ligands (Lindesmith, 2012).

Noroviruses are highly diverse and they can be classified into at least seven recognized genogroups (GI to GVII), among which GI, GII and GIV are associated with human infections. Additionally, the genogroups are divided into several genotypes based on the sequence differences of their VP1 proteins being that more than 30 genotypes are known to infect human beings (Kroneman 2013; Vinjé, 2015). The main driving forces of norovirus evolution are point mutations (antigenic drift), which occurs due to amino acid changes within the P2 subdomain of the capsid protein (VP1) and recombination, that most frequently occurs near the ORF1-ORF2 junction (or overlapping region), expanding viral repertoire (REF). Despite the great genetic diversity, the majority of cases and outbreaks are caused by the only genotype GII.4 that has been the most common genotype in circulation worldwide since mid-1990s. New variants of GII.4 have emerged every 2 or 3 years, spread rapidly across the globe and causing pandemics. Recent GII.4

variant forms have included Hunter_2004 (2004), Yerseke_2006a (2006), Den Haag_2006b (2006), NewOrleans_2009 (2009) and Sydney_2012 (2012). Recently, other genotypes (non-GII.4 strains) such as GII.17 and GII.2 have emerged and have become predominant in certain regions of the world.

The extensive genetic diversity of noroviruses and dynamic characteristics of its epidemiology represents a major obstacle to protective immunity after infection and development of an effective vaccine. A comprehensive understanding of genotype diversity, strain replacement patterns and dominant strains is essential for a successful vaccine design. In this study, we show the dynamic exchange of noroviruses genotypes in three different periods of time in Southeastern Brazil and identified emergent noroviruses recombinant in circulation.

2. Material and Methods

We utilized fecal samples from individuals with symptoms of acute gastroenteritis collected in three different periods: February 2003 to June 2004, December 2007 to June 2011 and September 2017 to September 2018. Samples of the first period were collected from children up to 3 years of age attended in the emergency room of a pediatric hospital (Barreira, 2010); samples from the second period come from individuals of all ages collected at all health units of the municipality of Vitoria – ES, and samples from third period were collected from children up to 11 years of age attended at two different locations: emergency room of a pediatric hospital and municipal emergency care unit, after respective free consent after clarification of the research and approval by the Institutional Ethics Committee. For the present study, noroviruses positive samples properly sequenced were included.

2.1 Molecular characterization

The viral RNA was extracted from stool suspensions (10% w/v) using the commercial QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Initially, norovirus detection was performed by RT-qPCR using primers and a probe targeting the ORF1/2 junction.

For genotyping, PCR were performed using the Mon431 (nt 4820 - 4839) and G2SKR (nt 5367 - 5389) primers targeting a 570 bp fragment covering the 3'-end ORF1 and 5'-end ORF2 (Beuret 2002, Kojima 2002). Sequencing was performed using the BigDye1 Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and ABI Prism 3730 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the genotype was assigned using the Norovirus Automated Genotyping Tool (Kroneman 2011). Phylogenetic trees (based on the partial sequences of ORFs1 and 2) were constructed

using the neighbor-joining method (Kimura two-parameter model, 2000 bootstrap replications for branch support) in MEGA 6.0 (Tamura, 2013). The 19 sequences of the ORF1/2 region will be deposited in GenBank.

3. Results

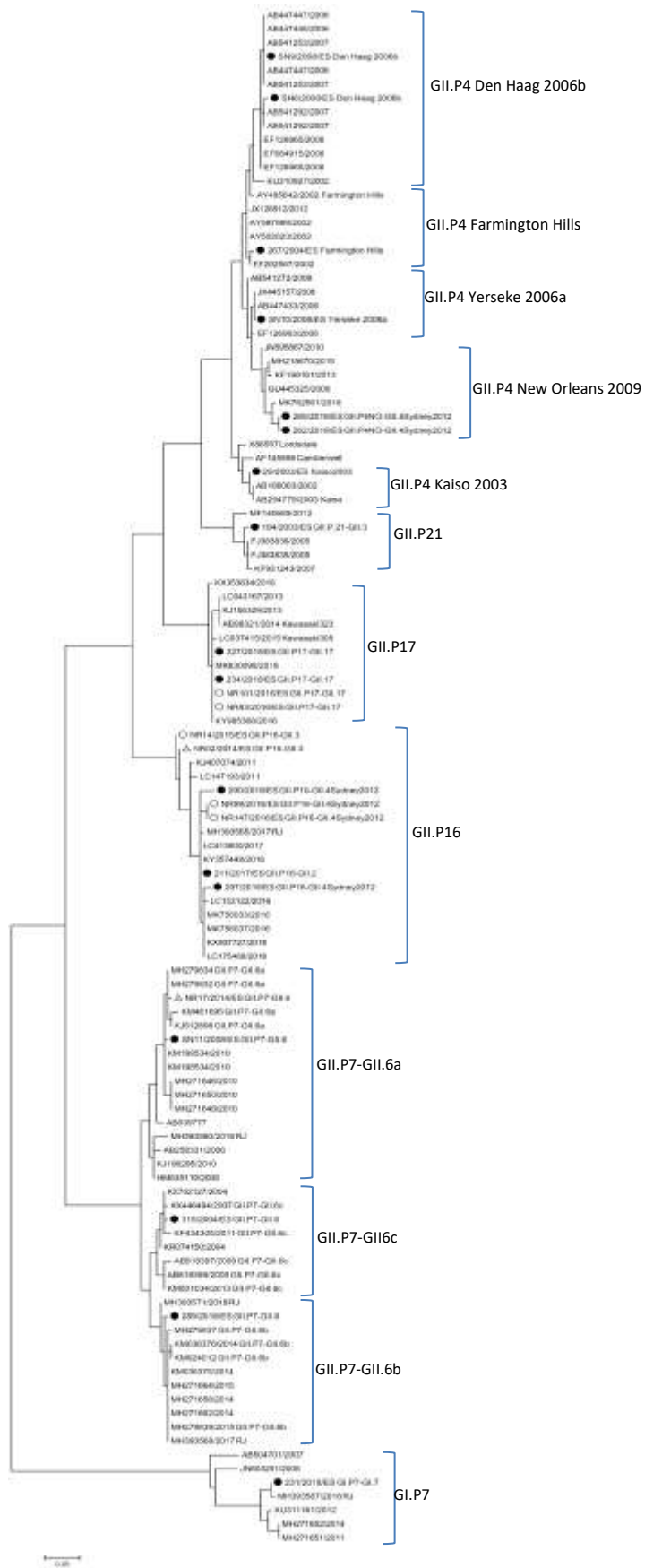
Eighteen noroviruses strains were properly sequenced and they are all shown in the Table 1. The phylogenetic analysis of both polymerase and capsid and results obtained with the genotyping tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) revealed eleven different genotypes, which among several GII.4 variants and emergent recombinants. Most strains belonging to genogroup II, only one was GI (Table 1, Figure 1).

GII.4 variants and the recombinant GII.P7-GII.6 was detected in all three collection periods. GII.4 variant Sydney 2012 was detected in association with two different polymerases, GII.P4 New Orleans 2009 and GII.P16. Furthermore, GII.P16 polymerase also was detected with GII.2 capsid.

Period	Collection on date	ORF1	ORF2
1 February 2003 - June 2004	March 2003	GII.P4	GII.4 Kaiso_2003
	September 2003	GII.P21	GII.3
	January 2004	GII.P4	GII.4 FarmingtonHills_2002
	May 2004	GII.P7	GII.6
2 December 2007- June 2011	January 2008	GII.P4	GII.4 DenHaag_2006b
	February 2008	GII.P4	GII.4 DenHaag_2006b
	May 2008	GII.P4	GII.4 Yerseke_2006a
	June 2008	GII.P4	GII.4 Yerseke_2006a
	October 2008	GII.P7	GII.6
3 September 2017- September 2018	October 2017	GII.P16	GII.2
	January 2018	GII.P17	GII.17
	March 2018	GI.P7	GI.7
	March 2018	GII.P17	GII.17
	May 2018	GII.P4 New Orleans 2009	GII.4 Sydney 2012
	June 2018	GII.P4 New Orleans 2009	GII.4 Sydney 2012
	July 2018	GII.P7	GII.6
	July 2018	GII.P16	GII.4 Sydney
	August 2018	GII.P16	GII.4 Sydney

Table 1. Distribution of noroviruses genotypes detected in three different periods in Southeastern Brazilian region.

A)



B)

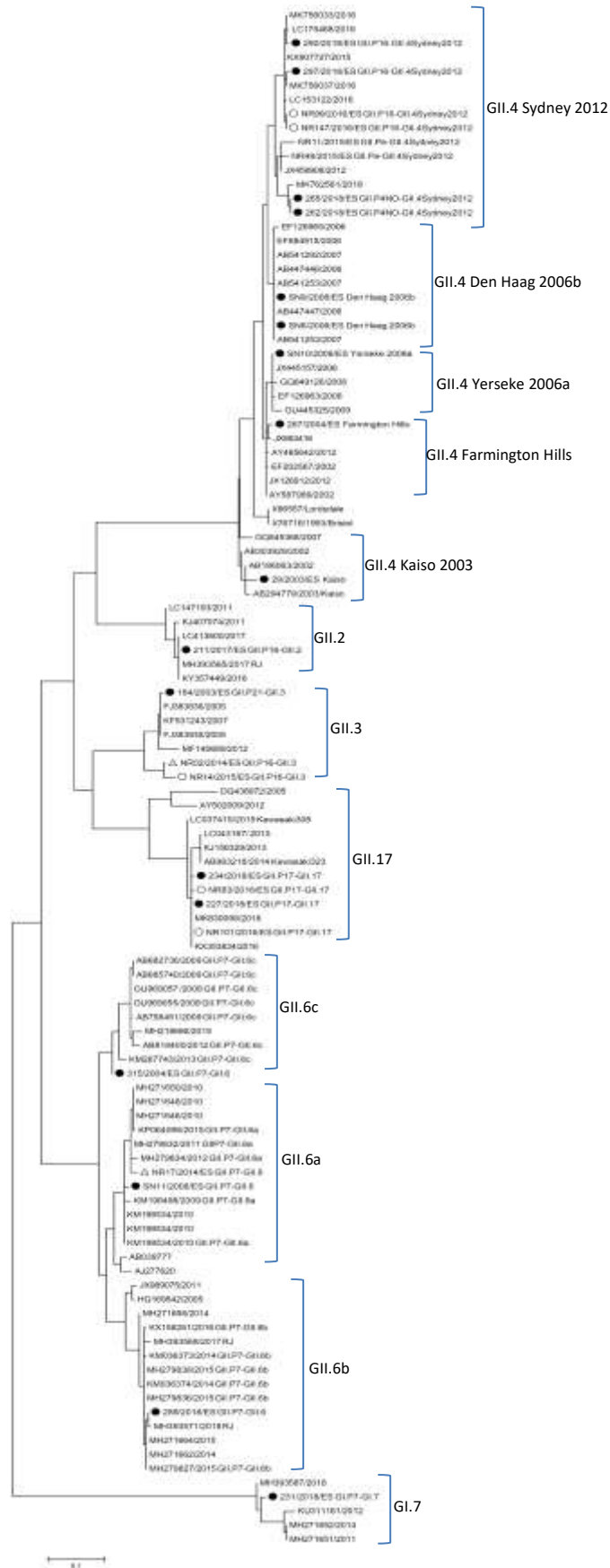


Figure 2. Phylogenetic analysis of GI and GII noroviruses based on partial nucleotide sequences of the polymerase (ORF-1) and capsid (ORF-2) regions. (A) Maximum likelihood phylogeny derived from partial 3' end of polymerase gene (231 bp) of noroviruses. (B) Maximum phylogeny derived from partial 50 end of capsid gene (277 bp) of noroviruses. The strains sequenced in this study are indicated by filled black circles. The strains described in previous article are indicated by empty circles (Barreira et al,2017). The unpublished strains are indicated by empty triangles.

4. Discussion

In this study we detected a great diversity of noroviruses, since we characterized eleven different genotypes, the most frequent being GII.4 variants (Farmington Hills 2002, Kaiso 2003, Den Haag 2006b, Yerseke 2006a and Sydney 2012), being the GII.4 Sydney 2012 in association with two different polymerases (GII.P4 New Orleans 2009 and GII.P16), besides genotypes GII.P7-GII.6, GII.P17-GII.17, GII.P21-GII.3, GII.P16-GII.2 and GI.P7-GI.7.

Norovirus GII was the most prevalent genogroup (17/18) in concordance with other studies even as in studies in Brazil and worldwide (Hoa Tran *et al*, 2013; Barreira *et al*, 2017; Siqueira *et al*, 2017); just a genotype GI was found (GI.P7-GI.7). Genotype GII.4 as the most frequently detected whereas is the most prevalent genotype worldwide associated with both gastroenteritis outbreaks and sporadic cases (Siebenga *et al*, 2009; Vinjé *et al*, 2015). In our study we found different GII.4 variants circulated throughout all sample collection periods.

The Kaiso 2003 variant, considered a no pandemic strain, was observed only at the first period of study. It was first described between April 2002 and March 2003 causing

outbreaks of gastroenteritis in Osaka City, Japan (Seto *et al*, 2005), and concomitantly detected in northern Brazil between 2001-2003 (Siqueira *et al*, 2016; Siqueira *et al*, 2017). Also, in the first period, in 2004, was detected the pandemic variant Farmington Hills 2002, being observed for the first time in Brazil. It emerged in 2002, associated with cruise ship and land-based outbreaks in the United States (Widdowson, *et al*, 2004) and became the predominant strain globally (Hoa-Tran *et al*, 2013). The pandemic variants Yerseke 2006a and Den Haag 2006b were present in the second collection period. These variants in early 2006 led to increased outbreaks of gastroenteritis in several countries (Kroneman *et al*, 2006; Tu *et al*, 2007). In Brazil, they were detected in Northeast, Southern, Southeastern regions associated outbreaks and sporadic cases of gastroenteritis (Fioretti *et al*, 2014; de Andrade *et al*, 2014; Siqueira *et al*, 2016; Siqueira *et al*, 2017). Recombinant GII.P21-GII.3 was detected only in the first collection period. The GII.3 capsid had already been detected in our geographic area, but associated with the polymerase GII.P16 (Barreira *et al*, 2017), while the GII.P21-GII.3 has been detected in others regions of Brazil (Fumian *et al*, 2016; Siqueira *et al*, 2017). Recombinant norovirus strain GII.P7/GII.6 has been detected throughout the world in the last years, including in the USA (Yang *et al*, 2016), China, Japan, Vietnam (Wu *et al*, 2015), South Africa (Mans *et al*, 2014), Burkina Faso (Huynen *et al*, 2013), Uruguay (Fajardo *et al*, 2014), Australia (Bruggink *et al*, 2016a), and Finland (Puustinen *et al*, 2011). In Brazil, GII.P7-GII.6 has been frequently reported in different regions, including North, Northeast, Southern and Southeastern regions, in association with acute gastroenteritis outbreaks or sporadic cases, between 2004 and 2015 (Cantelli *et al*, 2019; Fumian *et al*, 2016; Gondim *et al*, 2018; Hernandez *et al*, 2016; Reymão *et al*, 2018). In our study, three strains of this recombinant were detected distributed in all periods of collection (2004, 2008 and 2018), in addition to one strain from 2014 (unpublished data).

Interestingly, the strain from the first collection period (2004) clustered separately from strains of the most recent periods for both ORF1 and ORF2 (2008, 2014 and 2018), which suggests adaptive evolution in both the polymerase and viral capsid regions.

Two strains of the emergent variant GII.P17-GII.17 were detected in the third collection period, in 2018, although it had already been observed in our geographic area in 2016 (Barreira *et al*, 2017). The GII.P17-GII.17 became predominant in many countries in Asia during the 2014–2015 winter and since then has also been reported in other continents although with lower prevalence (Graaf *et al*, 2015; Matsushima *et al*, 2015). In Brazil, it has been detected since 2015 and seems to remain in circulation (Andrade *et al*, 2017; Silva *et al*, 2017; Cantelli *et al*, 2019).

The capsid Sydney 2012 was detected in association with polymerase GII.P4 New Orleans 2009 and GII.P16. Recombinant GII.P4 New Orleans 2009-GII.4 Sydney 2012 emerged in Italy in 2013 resulting from the association of capsid from last GII.4 variant Sydney 2012 with the polymerase from preceding GII.4 variant New Orleans 2009 (Martella *et al*, 2013) and was later detected in others countries, including Australia, New Zealand, Denmark, England, South Africa, EUA, Canada and Qatar (Lun 2018, Hasing 2019, Cannon 2017, Bruggink 2016b, Fonager 2013, Wong 2013, Mans 2014; Mathew *et al*, 2019). This study provides original data on detection of GII.P4 New Orleans 2009-GII.4 Sydney 2012 in Brazil. The recombinant GII.P16-GII.4 Sydney 2012 was described in 2016 in Japan (Matsushima *et al*, 2016), but it has been causing outbreaks since 2015, replacing GII.Pe-GII.4 Sydney 2012 in various parts of the world (Bidalot *et al*, 2017; Cannon *et al*, 2017; Lun *et al*, 2018; Hasing *et al*, 2019). In Brazil was described for the first time as the predominant strain in 2016 in our geographic area (Barreira *et al*, 2017). Furthermore, polymerase GII.P16 was also detected in association with variant GII.2. Recombinant GII.P16-GII.2 emerged during winter 2016–2017 in Asia and Germany,

causing rapid increase of noroviruses outbreaks, being detected also in others parts of the world (Niendorf et al, 2017; Ao et al, 2017; Bidalot et al, 2017), being recently detected in Brazil (Cantelli et al, 2019).

The results show clearly the dynamic nature of noroviruses epidemiology consistent with standard of circulation in the world, including the identification of emergent pandemic variants. The large diversity of noroviruses driven by different mechanisms of evolution associated with limited protective immune response makes it great challenge to formulate an effective vaccine.

5. Reference

AO Y, *et al.* Genetic Analysis of Reemerging GII.P16-GII.2 Noroviruses in 2016-2017 in China. **J Infect Dis.**, v. 218, n.1, p. 133-43, 2018.

AHMED SM, *et al.* Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis.**, v. 14, n. 8, p. 725-30, 2014.

ANDRADE JSR, *et al.* Detection and molecular characterization of emergent GII.P17/GII.17 Norovirus in Brazil, 2015. **Infect Genet Evol.**, v. 51, p. 28-32, 2017.

BARCLAY L, *et al.* [Emerging Novel GII.P16 Noroviruses Associated with Multiple Capsid Genotypes.](#) **Viruses**, v. 11, n. 6, 2019.

BARREIRA DM, *et al.* Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. **J Clin Virol.**, v. 47, n. 1, p. 60-64, 2010.

BARREIRA DMPG, *et al.* Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016. **PLoS One.**, v. 12, n.12, 2017.

BEURET C, *et al.* Norwalk-Like Virus Sequences in Mineral Waters: One-Year Monitoring of Three Brands. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1925–31, 2002.

BIDALOT M, *et al.* Emergence of new recombinant noroviruses GII.p16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017. **Euro Surveill.**, v. 22, n.15, 2017.

BRUGGINK LD, MOSELEN JM, MARSHALL JA. The Comparative Molecular Epidemiology of GII.P7_GII.6 and GII.P7_GII.7 Norovirus Outbreaks in Victoria, Australia, 2012-2014. **Intervirology**, v. 59, p. 60-65, 2016a.

BRUGGINK L, CATTON M, MARSHALL J. A norovirus intervariant GII.4 recombinant in Victoria, Australia, June 2016: the next epidemic variant? **Euro Surveill.**, v. 21, n. 39, 2016b.

CANNON JL, *et al.* 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.**, v. 55, n. 7, p. 2208-21, 2017.

- DE ANDRADE JDAS, *et al.* Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. **J Clin Virol.**, v. 61, n. 3, 2014.
- DE GRAAF M, *et al.* Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? **Euro Surveill.**, v. 20, n. 26, 2015.
- FAJARDO Á, *et al.* Phylogenetic analyses of Norovirus strains detected in Uruguay reveal the circulation of the novel GII.P7/GII.6 recombinant variant. **Infect Genet Evol.**, v. 28, p. 328-32, 2014.
- FIORETTI JM, *et al.* Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–7 , 2014.
- FONAGER J, BARZINCI S, FISCHER TK. Emergence of a new recombinant Sydney 2012 norovirus variant in Denmark, 26 December 2012 to 22 March 2013. **Euro Surveill.**, v. 18, n. 25, 2013.
- FUMIAN TM, *et al.* Norovirus Recombinant Strains Isolated from Gastroenteritis Outbreaks in Southern Brazil, 2004-2011. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 2016.
- GONDIM RDG, *et al.* Genetic Diversity of Norovirus Infections, Coinfections, and Undernutrition in Children From Brazilian Semiarid Region. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 67, n. 6, p. 117-22, 2018.
- GREEN K, *et al.* Caliciviridae: The Noroviruses. In: KNIPE DM, *et al* (Orgs.). **Fields' Virology**, 6. ed, Philadelphia, 2013.
- HASING ME, *et al.* Changes in norovirus genotype diversity in gastroenteritis outbreaks in Alberta, Canada: 2012-2018. **BMC Infect Dis.**, v. 19, 2019.
- HERNANDEZ JM, *et al.* Molecular epidemiology and temporal evolution of norovirus associated with acute gastroenteritis in Amazonas state, Brazil. **BMC Infect Dis.**, v. 18, 2018.
- HOA TRAN TN, *et al.* Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. **J Clin Virol.**, v. 56, n. 3, p.185-93, 2013.

- HUYNEN P, *et al.* Molecular epidemiology of norovirus infections in symptomatic and asymptomatic children from Bobo Dioulasso, Burkina Faso. **J Clin Virol.**, v. 58, n. 3, p. 515-21, 2013.
- KOJIMA S, *et al.* Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 100, n.1–2, p. 107–114, 2002.
- KRONEMAN A, *et al.* Increase in norovirus activity reported in Europe. **Euro Surveill.**, v. 11, n. 50, 2006.
- KRONEMAN A, *et al.* An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 51, n. 2, p. 121–25, 2011.
- KRONEMAN A, *et al.* Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. **Arch Virol.**, v. 158, n.10, p. 2059-68, 2013.
- LINDESMITH LC, *et al.* Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, 2012.
- LUN JH, *et al.* Emerging recombinant noroviruses identified by clinical and waste water screening. **Emerg Microbes Infect.**, v. 7, n.1, 2018.
- MANS J, MURRAY TY, TAYLOR MB. Novel norovirus recombinants detected in South Africa. **Virol J.**, v. 11, 2014.
- MARTELLA V, *et al.* Evidence for recombination between pandemic GII.4 norovirus strains New Orleans 2009 and Sydney 2012. **J Clin Microbiol.**, v. 51, n. 11, p. 3855-57, 2013.
- MATHEW S, *et al.* Epidemiological, Molecular, and Clinical Features of Norovirus Infections among Pediatric Patients in Qatar. **Viruses**, v. 11, n. 4, 2019.
- MATSUSHIMA Y, *et al.* Complete genome sequence of a recombinant GII.P16-GII.4 Norovirus detected in Kawasaki city, Japan, in 2016. **Genome Announc.**, v. 4, n. 5, 2016.
- MATSUSHIMA Y, *et al.* 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.**, v. 20, n. 26, 2015.

NIENDORF S, *et al.* Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, Germany, winter 2016. **Euro Surveill.**, v. 22, n. 4, 2017.

PARRA GI, *et al.* 2017. Static and Evolving Norovirus Genotypes : Implications for Epidemiology and Immunity. **PLoS Pathog.**, v. 13, n. 1, 2017.

PUUSTINEN L, *et al.* Noroviruses as a major cause of acute gastroenteritis in children in Finland, 2009-2010. **Scand J Infect Dis.**, v. 43, n. 10, p. 804-08, 2011.

REYMÃO TKA, *et al.* Norovirus RNA in serum associated with increased fecal viral load in children: Detection, quantification and molecular analysis. **PLoS One.**, v. 13, n. 7, 2018.

SETO Y, *et al.* Genotyping of Norovirus strains detected in outbreaks between April 2002 and March 2003 in Osaka City, Japan. **Microbiol Immunol.**, v. 49, n. 3, p. 275-83, 2005.

SIEBENGA JJ, *et al.* Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. **J Infect Dis.**, v. 200, n. 5, p. 802-12, 2009.

SILVA LD, *et al.* Detection and genetic characterization of the emergent GII.17_2014 norovirus genotype among children with gastroenteritis from Northern Brazil. **Infect Genet Evol.**, v. 48, p. 1-3, 2017.

SIQUEIRA JAM, *et al.* Characterization of novel intragenotype recombination events among norovirus pandemic GII.4 variants. **Infect Genet Evol.**, v. 44, p. 361-55, 2016.

SIQUEIRA JAM, *at al.* Genotype diversity and molecular evolution of noroviruses: A 30-year (1982-2011) comprehensive study with children from Northern Brazil. **PLoS One.**, v. 12, n. 6, 2017.

TAMURA K, *at al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 30, n. 12, p. 2725-29, 2013.

TU ET, *et al.* Norovirus GII.4 strains and outbreaks, Australia. **Emerg Infect Dis.**, v. 13, n. 7, 2007.

VINJÉ J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. **J Clin Microbiol.**, v. 53, n. 2, p. 373-81, 2015.

VINJÉ J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. **J Clin Microbiol.**, v. 53, n. 2, p. 373-81.

WIDDOWSON MA, *et al.* Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus—United States, 2002. **J. Infect. Dis.**, v. 190, n. 1, p. 27-36, 2004.

WONG TH, *et al.* Whole genome sequencing and de novo assembly identifies Sydney-like variant noroviruses and recombinants during the winter 2012/2013 outbreak in England. **Virology**, v. 10, 2013.

WU X, *et al.* Prevalence and genetic diversity of noroviruses in adults with acute gastroenteritis in Huzhou, China, 2013-2014. **Arch Virol.**, v. 160, n. 7, p. 1705-13, 2015.

YANG Z, *et al.* Complete Genome Sequence of Human Norovirus Strain GII.P7-GII.6 Detected in a Patient in the United States in 2014. **Genome Announc.**, v. 4, n. 5, 2016.